

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kateřina Balounová

Úloha microRNA v regulaci cirkadiánních rytmů a při tumorigenezi kolorektálního karcinomu

Role of microRNA in regulation of circadian rhythms and tumorigenesis

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.5.2014

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli profesoru Jiřímu Páchovi za jeho laskavost a ochotu stát se mým školitelem a své rodině za její trpělivost. Zvláštní poděkování patří doktoru Matúši Sotákovi za jeho nedocenitelné konzultace.

Abstrakt

MicroRNA (miRNA) jsou ~22nt dlouhé jednořetězcové RNA vyskytující se napříč všemi skupinami organismů, kde pomocí regulace exprese proteinů ovlivňují biochemické, fyziologické i behaviorální dráhy. Regulace exprese proteinů probíhá prostřednictvím umlčení jejich mRNA jedním ze dvou procesů, translační represí nebo degradací mRNA. Změna exprese miRNA může vést k narušení miRNA-dependentní dráhy a následně k různým patofyziologickým stavům jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina či neurologické poruchy. V rakovině může miRNA působit jako onkogen i tumor-supresor a v různých typech rakoviny a tkáních zastávat různé role. V kolorektálním karcinomu miRNA pozitivně či negativně zasahuje do regulace signálních drah ovlivňujících klíčové procesy vývoje rakoviny jako proliferaci, buněčný cyklus, apoptózu, buněčnou invazi i metastázování. Cirkadiánní hodiny u savců synchronizují procesy v těle organismu pomocí transkripčně-translačních zpětných vazeb. MiRNA nejen regulují hladiny klíčových hodinových genů a jejich kofaktorů, ale zároveň řada miRNA má cirkadiánně řízenou expresi. Narušení cirkadiánního rytmu proto zvyšuje riziko rakoviny mimo jiné přes cirkadiánní změnu exprese microRNA. Hlavním cílem mé práce bylo identifikovat miRNA regulující jak tumorigenezi, tak cirkadiánní rytmy. V textu uvádím 37 miRNA s touto charakteristikou, jež se mi podařilo identifikovat z literatury a databází miRNA.

Klíčová slova: microRNA, rakovina, kolorektální karcinom, cirkadiánní hodiny, cirkadiánní rytmus

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are ~22nt long single-strand RNA found in all groups of organisms, where they affect biochemical, physiological and behavioral pathways by regulation of protein expression. Regulation of protein expression is mediated by silencing mRNA of target genes in one of two processes, translation repression or degradation of mRNA. Changed expression of miRNA can lead to aberrant regulatory pathways resulting in various pathophysiological conditions like cardiovascular diseases, cancer or neurological disorders. MiRNA can play a role in cancer both as an oncogen or as a tumor suppressor, and it is tissue and cancer-type specific. In colorectal cancer miRNAs downregulate or upregulate signaling pathways including key processes involved in cancer development, like proliferation, cell cycle, apoptosis and metastasis formation. Circadian clock in mammals synchronizes cellular and physiological processes by transcriptional-translational feedback loops. Not only miRNAs regulate the levels of key clock genes and clock-controlled genes, but also a number of miRNAs exhibit circadian expression. Therefore aberrant circadian rhythms increase risk of colorectal cancer also by altered expression of miRNAs. The main aim of the thesis was to identify miRNAs, which regulate both tumorigenesis and circadian rhythms. Using data from literature and miRNA databases I identified 37 miRNAs with this characteristic.

Keywords: microRNA, cancer, colorectal carcinon, cirkadian clock, circadian rhythm

Obsah

1	Úvod	1
2	MicroRNA	2
2.1	Nomenklatura miRNA	2
2.2	Biogeneze miRNA	3
2.3	Regulace biogeneze a stabilita miRNA	6
2.4	Mechanismy miRNA	6
2.4.1	Navázání a vyhledávání cílové mRNA.....	6
2.4.2	Translační represe	7
2.4.3	Degradace mRNA	7
2.5	Shrnutí funkce miRNA	7
3	MiRNA a rakovina.....	8
3.1	Mechanismy změn miRNA	8
3.1.1	Genetické změny	9
3.1.2	Epigenetické změny.....	9
3.1.3	Deregulace transkripčních faktorů	10
3.1.4	Změny v biogenezi miRNA.....	11
3.2	Role miRNA v tumorigenezi.....	11
4	MiRNA v kolorektálním karcinomu	12
4.1	Raná fáze CRC/Aktivace Wnt/ β -kateninové dráhy.....	13
4.2	Pokročilé stádium CRC/ Zabezpečení proliferace a vyhnutí se apoptóze	14
4.2.1	KRAS signalizační dráha	14
4.2.2	PI3K/AKT signalizační dráha	15
4.2.3	p53 signalizační dráha	16
4.3	Pozdní stádium CRC a metastáze / Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný růst, angiogeneze, neomezený replikační potenciál, invazita a metastazování	17
4.3.1	TGF- β signalizační dráha.....	17
4.3.2	EMT.....	18
5	MiRNA a regulace cirkadiánních rytmů.....	18
6	MiRNA v kolorektálním karcinomu spjaté s regulací cirkadiánních rytmů	22
7	Závěr	26
8	Seznam zkratk	27
9	Seznam použité literatury	29

1 Úvod

Fenomén microRNA je poměrně mladým tématem biologie. MicroRNA (miRNA) byly u organismů objeveny až v 90. letech 20. století a řadí se do skupiny malých nekódujících RNA společně například se siRNA a piRNA (Bartel, 2009). Významně se podílejí na regulaci genové exprese a tím i na regulaci biochemických, fyziologických a behaviorálních drah v celém organismu.

V posledních letech bylo detekováno mnoho miRNA, jejichž exprese je pozměněna či úplně potlačena v rakovině a dalších onemocněních. Jedním z druhů rakovina je i rakovina tlustého střeva, kolorektální karcinom (Esquela-Kerscher a Slack, 2006). V ČR patří rakovina tlustého střeva mezi nejčastější formu rakoviny s vysokým procentem úmrtnosti. Studie poukázaly na možnou souvislost mezi určitými typy rakovin a narušením cirkadiánních rytmtů například prostřednictvím dlouhodobé práce na směny. Mezi těmito formami rakoviny byla nalezena i rakovina tlustého střeva (Ferlay et al., 2013; Haus a Smolensky, 2006).

Cílem mojí práce bude seznámit s miRNA, poukázat na změny jejich exprese v rakovině a nastínit roli jakou zastávají v regulaci kolorektálního karcinomu a cirkadiánních rytmech. V neposlední řadě se budu snažit identifikovat miRNA, které se účastní jak regulace cirkadiánních rytmtů, tak i regulace kolorektálního karcinomu.

2 MicroRNA

MiRNA patří do skupiny malých, nekódujících RNA (Castilla-Llorente et al., 2013; Lau et al., 2001; Rodriguez et al., 2004; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Tyto ~22nt dlouhé jednořetězcové RNA, které dnes patří mezi jedny z nejvýznamnějších objevů moderní biologie, se nacházejí v jednobuněčných i mnohobuněčných eukaryotech, rostlinách, zelených řasách i virech (Bartel, 2009; Shukla et al., 2011; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

První miRNA *lin-4* byla objevena R.C. Leeovou, R.L. Feinbaumovou a V. Ambrosem při studiu vlivu genu *lin-4* na načasování larválního vývoje *Caenorhabditis elegans* v roce 1993 (Lee et al., 1993). Předpokládalo se, že gen *lin-4* exprimuje produkt, který negativně reguluje produkci proteinu *lin-14* navázáním na 3'UTR (untranslated region, nepřekládaná oblast) *lin-14* mRNA (Wightman et al., 1991). Ambros se svými kolegyněmi zjistil, že gen *lin-4* nekóduje protein, ale 2 krátké transkripty, 22nt a 61nt dlouhé, obsahující komplementární sekvenci k 3'UTR *lin-14* mRNA, čímž regulují expresi proteinu *lin-14* (Lee et al., 1993). Po osmi letech bylo objeveno, že gen *let-7* kóduje jinou 21nt dlouhou RNA komplementární k více 3'UTR genů a tím ovlivňuje expresi těchto genů a přechod z posledního larválního stádia *Caenorhabditis elegans* do dospělého (Reinhart et al., 2000). *Lin-4* a *let-7* byly označeny za malé, časově regulační RNA (stRNA) (Pasquinelli et al., 2000) a později za zakládající členy rodiny miRNA (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001). Delší, 61nt dlouhá, vlásenková struktura RNA byla identifikována jako prekursor miRNA (Pasquinelli et al., 2000).

MiRNA geny můžeme rozlišit podle jejich umístění v genomu. Sekvence miRNA může být umístěna na nekódující transkripční jednotce v intronech, nekódující transkripční jednotce v exonech a protein kódující transkripční jednotce v intronech (Rodriguez et al., 2004). V některých případech může být miRNA lokalizována na intronu i exonu nekódující transkripční jednotky v závislosti na jejím alternativním sestřihu (Saini et al., 2007).

Více jak polovina savčích miRNA genů se nalézají v clusterech (Kim a Nam, 2006), jež mohou být transkribovány jako polycistronní primární transkripty. Dále mohou být miRNA geny transkribovány jako samostatné transkripční jednotky s vlastními promotory či náhodně s host geny a jejich promotory (Lagos-Quintana et al., 2001; Saini et al., 2007).

2.1 Nomenklatura miRNA

MiRNA je stanovena jako ~22 nt dlouhá ssRNA (Ambros et al., 2003; Kim, 2005; Krol et al., 2010). Aby mohla být uznána jako miRNA, dle současné konvence z roku 2003 (Ambros et al., 2003) musí nová miRNA splňovat několik kritérií týkající se její exprese a biogenese. Zaprvé, exprese musí být detekována hybridizací vzorku RNA definované velikosti, nejčastěji pomocí Northern blotu, být identifikována knihovnou cDNA a transkript se musí shodovat se zkoumanou sekvencí RNA ve vybraném organismu (Ambros et al., 2003). Zadruhé, miRNA sekvence by se měla nacházet na jednom

rameni vlásenkové struktury prekursoru miRNA. Tato vlásenková struktura se skládá za využití nejmenší možné energie a nesmí obsahovat vnitřní smyčky či výdutě. Zatřetí, nejen samotná miRNA, ale i její pre-miRNA musí jevit známky fylogeneticky konzervované struktury (Kim, 2005). Začtvrté, při snížené funkci Dicer enzymu dochází ke zvýšení koncentrace pre-miRNA v cytoplasmě (Ambros et al., 2003; Kim, 2005). Za adekvátní důkaz miRNA se považuje splnění kritérií 1-3, eventuálně při absenci dat pouze 3 a 4 (Ambros et al., 2003).

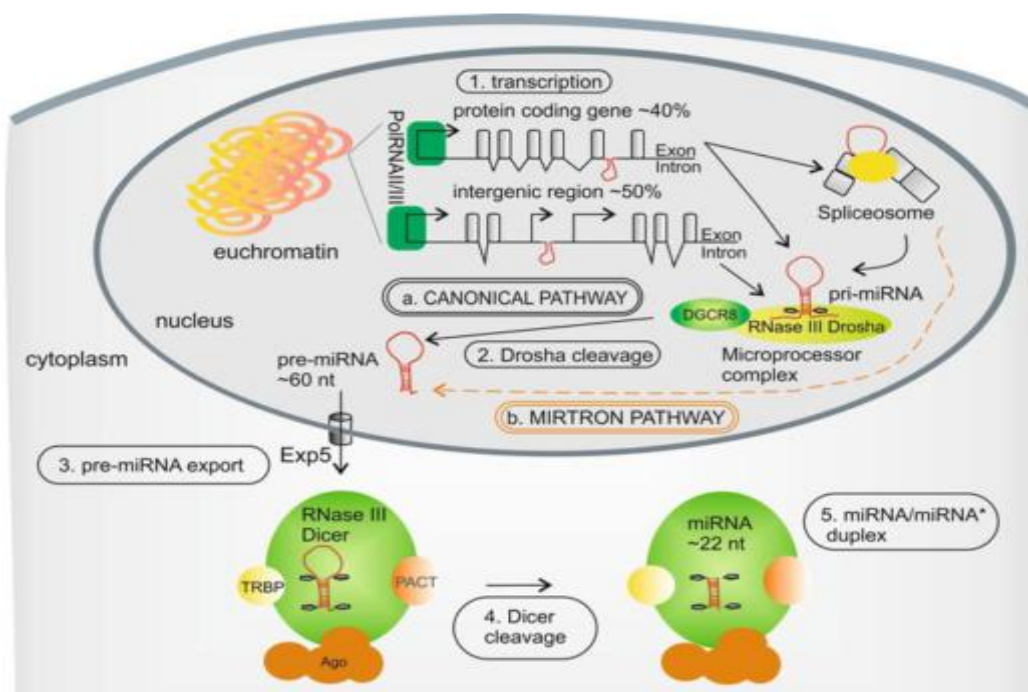
Maturovaná forma miRNA je definovaná pomocí předpony miR a specifického identifikačního čísla, které se přiděluje dle pořadí objevení miRNA (Ambros et al., 2003). Před touto předponou předchází 3 až 4 písmena, která určují druh organismu, jako například *Mus musculus* mmu, *Homo sapiens* hsa (Griffiths-Jones et al., 2006). Při nalezení homologní miRNA v různých organismech se identifikační číslo nemění. Prekurzoru miRNA je přidělena předpona mir a stejné identifikační číslo jako z něj vzniklé miRNA. Pokud z různých prekurzorů pochází jedna miRNA, jsou tyto prekurzory rozlišeny číselnou příponou, například dme-mir-6-1 a dme-mir-6-2 z *Drosophily melanogaster*. Sekvencím lišícím se o 1 až 2 báze náleží písmenné přípony, jako miR-181a a miR-181b (Ambros et al., 2003; Griffiths-Jones, 2004). Z jednoho prekurzoru miRNA mohou pocházet dvě miRNA, z každého ramena jedna. Pokud se vědělo, která miRNA se exprimuje jako první, byla druhá miRNA označena příponou *, miR-56 a miR-56* u *C. elegans*. Pokud se nezjistilo, která sekvence je dominantní, používalo se označení miR-142-s (5'rameno) a miR-142-as (3'rameno). Novější pojmenování je miR-17-5p (5'rameno) a miR-17-3p (3'rameno) (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006). Historickou výjimkou z nomenklatury jsou let-7 a lin-4, první dvě objevené miRNA. Rostlinné miRNA jsou odlišeny pomocí předpony MIR (Griffiths-Jones, 2004).

2.2 Biogeneze miRNA

Biogeneze savčí miRNA se skládá ze dvou fází, první probíhá v jádře a druhá v cytoplasmě (Obrázek 2.1.). Jak již bylo uvedeno, miRNA geny mohou být transkribovány třemi způsoby: jako samostatné transkripční jednotky, náhodně se svými host geny či jako polycistronní primární transkripty (Lagos-Quintana et al., 2001; Saini et al., 2007). Přibližně polovina miRNA má vlastní promotory (Tétreault a De Guire, 2013). Až na výjimky je transkripce řízena RNA polymerázou II (Pol II) (Kim a Nam, 2006; Krol et al., 2010), ale některé virové miRNA geny mohou být transkribovány pomocí RNA polymerázy III (Pol III) (Pfeffer et al., 2005). Produktem transkripce je primární miRNA transkript (pri-miRNA), který může být až tisíce nukleotidů dlouhý a již obsahuje vlásenkovou strukturu, 5'čepičku a 3'polyA konec (Castilla-Llorente et al., 2013; Kim a Nam, 2006; Tétreault a De Guire, 2013).

Většina pri-miRNA je kotranskripčně rozpoznána velkým proteinovým komplexem, nazývaným mikroprocesor. Mikroprocesor zajišťuje štěpení pri-miRNA na ~60nt dlouhý vlásenkový prekurzor

miRNA (pre-miRNA), tzv. odříznutí pre-miRNA (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Kim, 2005; Kim a Nam, 2006; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Hlavní složkou tohoto komplexu je RNáza III Drosha a její kofaktor (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Drosha je ~160kDa velký protein obsahující 2 domény RNázy III (RIIID) a dvojřetězcovou RNA-vážící doménu (dsRBD) (Kim, 2005; Lee et al., 2003). Kofaktorem Droshy je Di-Georgův syndrom kritického regionu genu 8 (DGCR8), u *Drosophily melanogaster* existuje homolog DGCR8 zvaný Pasha (Shukla et al., 2011). Jeho dvě dsRBD domény pravděpodobně zaručují substrátovou specifitu a přesnost štěpení Droshy (Carthew a Sontheimer, 2009; Kim a Nam, 2006). Dále asociují s mikroprocesorem další proteiny, jako jsou helikázy nebo heterogenní jaderné ribonukleoproteiny (hnRNP), pravděpodobně sloužící k usnadnění kotranslačních úprav (Finnegan a Pasquinelli, 2013).



Obrázek 2.1. Biogeneze miRNA u savců. Na obrázku je znázorněná, jak kanonická biogenetická dráha, tak dráha biogeneze mirtronů. Převzato z Stroynowska-Czerwinska et al., 2014.

Existují i cesty štěpení pri-miRNA nezávislé na Mikroprocesoru, odlišné od kanonické dráhy. Jednou z nich je navázání na spliceosom, kde dochází k sestřihu pri-miRNA (Krol et al., 2010). Po sestřihu dochází k odstranění intronového larátu pomocí debranching enzymu a následnému složení intronů do konečné pre-miRNA (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Havens et al., 2012). Tuto cestu využívají miRNA pocházející z krátkých intronů, nazvané mirtrony (Obrázek 2.1.) (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Ačkoli jsou méně hojné než Drosha závislé miRNA, byly již objeveny v obratlovcích, bezobratlých i rostlinách (Finnegan a Pasquinelli, 2013).

Pro další vývoj je nutné pre-miRNA transportovat z jádra do cytoplasmy (Kim, 2005; Kim a Nam, 2006). K tomu slouží Exportin 5 (Exp5), jež se řadí mezi Ran-GTP závislé přenašeče. Exportin 5 také stabilizuje pre-miRNA zabráněním její degradace exonukleázami (Finnegan a Pasquinelli, 2013).

V cytoplasmě se pre-miRNA zpracuje pomocí enzymatického komplexu RNázy III Diceru na ~22nt dlouhé miRNA duplexy (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Kim a Nam, 2006). Dicer patří mezi konzervované proteiny o velikosti kolem 200nt. Vyskytuje se téměř ve všech eukaryotických skupinách. Některé organismy obsahují více homologů Diceru, které zastávají v organismu odlišné úlohy (Kim, 2005). Dicer je charakterizován přítomností helikázy, 2 domén RNázy III, dsRBD, DUF283 doménou, PAZ doménou a asociuje s několika dalšími proteiny, mezi které patří například Argonaut proteiny, RDE-4 či FMR-1 (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Kim, 2005).

Po navázání pre-miRNA na Dicer pomocí dsRBD (u savců TRBP) a PAZ domény (rozeznává 2nt přesah na 3'konci pre-miRNA) každá ze 2 domén RNázy III odštěpí jedno vlákno pre-miRNA, čímž se do cytoplasmy uvolní RNA smyčka a vzniká nám duplex miRNA/miRNA* (Carthew a Sontheimer, 2009; Kim, 2005; Krol et al., 2010).

Duplex je tvořen z hlavního vlákna miRNA (guide strand) a vedlejšího vlákna miRNA* (passenger strand) (Takahashi et al., 2014). Výběr hlavního vlákna závisí na relativní termodynamické stabilitě 5'konců miRNA, tzv. pravidlo asymetričnosti. Vlákno miRNA s nestabilnějším 5'koncem je uchováno v miRISC a označeno za mateřské vlákno miRNA. Dále jsou upřednostňovány A, U báze před C, G. Navíc také závisí na efektivitě navázání (př. postavení duplexu) či kombinaci sekvencí (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

Duplex miRNA/miRNA* je začleněn do ribonukleoproteinového komplexu zvaném miRNA-indukovaný umlčující protein (miRISC, miRNA induced silencing protein) (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014; Takahashi et al., 2014). Hlavní složkou miRISC jsou zástupci proteinů z rodiny Argonaut, v lidských buňkách se nachází 4 parology AGO1-4 a každý z nich se skládá ze 4 domén: PAZ, Mid, C-koncové PIWI a N-koncové domény.

Mateřský miRISC se formuje v několika krocích (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). V prvním kroku dochází k formování pre-miRISC a začlenění duplexu miRNA/miRNA*. Duplex se transportuje z Diceru do Argonaut proteinu, který je součástí RISC navazujícího komplexu (RLC, RISC loading complex). Mezi jeho hlavní komponenty patří Dicer, Argonaut protein a RBD (TRBP). Tento proces vyžaduje energii ve formě ATP (Kawamata et al., 2009) a 5'fosfátový konec miRNA. Poté dochází k uvolnění Diceru (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Hlavní vlákno miRNA asociuje 3'koncem s PAZ doménou, 5'koncem s Mid doménou. Centrální část mateřské miRNA se nachází v PIWI doméně. V Argonaut proteinu dochází k aktivnímu vklínění N-terminální domény mezi vlákna miRNA a odvíjení duplexu miRNA/miRNA* za pomoci PAZ domény. Uvolněné vedlejší vlákno je poté degradováno v cytoplasmě (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

V některých případech nemusí být vedlejší vlákno degradováno, ale je začleněno do nového miRISC komplexu (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

Hlavní vlákno miRNA v miRISC rozeznává podle komplementarity sekvencí cílové mRNA. Následně dochází buď k translační represi či deadenylaci a následované degradaci cílové mRNA (Krol et al., 2010; Takahashi et al., 2014).

2.3 Regulace biogeneze a stabilita miRNA

Většina miRNA je pod kontrolou vývojových a tkáňově specifických signalizačních drah (Kim, 2005). Mnoho miRNA vzniká pod kontrolou cílů, které sami regulují (Carthew a Sontheimer, 2009). Biogeneze miRNA může být regulována v každém jednotlivém kroku vývoje, často i na více úrovních (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Saini et al., 2007). Hlavním kontrolním mechanismem je pravděpodobně transkripční regulace (Kim, 2005; Saini et al., 2007).

Bylo zjištěno, že některé miRNA jsou schopné obejít základní kroky své biogeneze (Finnegan a Pasquinelli, 2013).

Argonaut působí jako limitující faktor ovlivňující stabilitu miRNA. Stabilita miRNA aspoň částečně také závisí na počtu vazebných míst v buňce. Stupeň komplementarity miRNA k cílové mRNA také ovlivňuje její stabilitu, čím je vyšší komplementarita, tím rychlejší je rozpad (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Gurtan a Sharp, 2013).

2.4 Mechanismy miRNA

2.4.1 Navázání a vyhledávání cílové mRNA

V klasické miRNA biogenezi nachází miRISC částečně komplementární úsek mRNA a váže se na něj. Účinnost vazby miRISC na cílovou mRNA je závislá na strukturální charakteristice RNA, například na přístupnosti cílové sekvence mRNA (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Nejčastěji se miRNA vazebné místo nachází v „seed“ oblasti, 2-8nt dlouhém úseku na 5'konci miRNA (Bartel, 2009; Carthew a Sontheimer, 2009), z čehož je pouze 37% interakcí vázáno pomocí nepřerušného Watson-Crick párování (Helwak et al., 2013). Většina miRNA se váže nepřesně a s výdutěmi. Úroveň komplementarity miRNA patří k hlavním regulačním mechanismům translační represe (Carthew a Sontheimer, 2009).

MiRNA se páruje s cílovou sekvencí mRNA, která se zpravidla nachází na 3'UTR (Bartel, 2004). V posledních letech se ale vyskytla vazebná místa i v kódující sekvenci (CDS) (Duursma et al., 2008; Helwak et al., 2013) a na 5'UTR (Bartel, 2009; N et al., 2009). Počet cílových vazebných míst v mRNA a jejich vzdálenost od sebe ovlivňuje úspěšnost genové exprese (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

2.4.2 Translační represe

MiRNA potlačuje mRNA pomocí translační represe nebo nepřímé degradace. Přesný mechanismus není zatím objasněn (Zhao a Liu, 2009), avšak oba mechanismy vyžadují přítomnost proteinu z rodiny Argonaut a proteinu GW182 (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

K zahájení translace musí mRNA obsahovat 5'metylguanositovou čepičku a 3'polyA-konec (Shukla et al., 2011). K translační represi může docházet buď při iniciaci translace (Hirschler et al., 2010) nebo až post-iniciačně (Nottrott et al., 2006). Jsou známy různé studie na podporu obou těchto variant (Carthew a Sontheimer, 2009). Existují 3 modely translační represe při iniciaci, které se od základů liší (Carthew a Sontheimer, 2009). První model tvrdí, že miRISC stimuluje deadenylaci polyA konce mRNA, tím blokuje navázání polyA-binding proteinu na mRNA, takže nedochází k zakulacování mRNA (Fabian et al., 2010). Druhý model navrhuje kompetování miRISC s iniciačním faktorem translace eIF4E komplexem v navázání na 5'metylguanositovou čepičku. Třetí model tvrdí, že miRISC blokuje asociaci 60S ribozomální podjednotky s 40S preiniciačním komplexem. Tento model stojí na nálezech miRNA-inhibovaných mRNA, které neobsahovaly ribozomy nebo jen pár (Carthew a Sontheimer, 2009; Fabian et al., 2010; Zhao a Liu, 2009). Post-iniciační translační represe předpokládá, že miRISC může způsobovat předčasné ukončení translace a odváznutí ribozomu (Petersen et al., 2006) či miRISC navazuje proteolytické enzymy, které následně degradují vytvářející se mRNA (Fabian et al., 2010; Nottrott et al., 2006). V posledních letech se objevily i studie zabývající se vlivem miRNA na stimulaci genové exprese (Vasudevan, 2011).

2.4.3 Degradace mRNA

MiRNA může zprostředkovávat přímou či nepřímou degradaci mRNA (Zhao a Liu, 2009). K degradaci mRNA dochází i bez předchozí translační represe (Carthew a Sontheimer, 2009). MiRISC naváže deadenylační komplex (CCR4-NOT1), který odstraní polyA-konec a destabilizuje mRNA. Buď je předem odstraněna 5'metylguanositová čepička, nebo dochází rovnou k degradaci mRNA exoribonukleázami ve směru 3'-5' (Fabian et al., 2010).

2.5 Shrnutí funkce miRNA

MiRNA ovlivňuje řadu buněčných drah, hraje roli v diferenciaci hematopoetických buněk, apoptóze, buněčné proliferaci, organogenezi apod. (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Kim, 2005). Ovlivnění funkce miRNA může vést ke vzniku mnoha nemocí, včetně neurologických poruch, rakoviny či kardiovaskulárních problémů (Finnegan a Pasquinelli, 2013; Shukla et al., 2011; Tétreault a De Guire, 2013).

3 MiRNA a rakovina

Rakovina je komplexní genetické onemocnění zahrnující strukturální abnormality a změny v expresi kódujících i nekódujících genů (Calin a Croce, 2006). Tumorigeneze u lidí i myší je vícestupňový proces, ve kterém se postupně mění normální buňky na maligní. Při transformaci buněk dochází k procesům zabezpečujícím úspěšné narušení obranných mechanismů organismu: k vytvoření neomezeného replikačního potenciálu, soběstačnosti v produkci růstových signálů, necitlivosti k signálům zastavujícím růst, změnám v metabolismu, vyhnutí se apoptóze a imunitnímu systému, posílení angiogeneze a vytvoření schopnosti invadovat a metastazovat (Hanahan a Weinberg, 2000, 2011).

Z předchozí kapitoly jsme se dozvěděli, že miRNA ovlivňují translační represi či dokonce degradaci mRNA (Krol et al., 2010), včetně těch mRNA, které zprostředkovávají důležité procesy v tumorigenezi jako je regulace buněčného cyklu, stresová odpověď, proliferace, diferenciaci, apoptóza, metastáze a recidiva rakoviny (Farazi et al., 2011; Finnegan a Pasquinelli, 2013; Kim, 2005). Různými molekulárními technikami byly zjištěny změny exprese miRNA v tumorech oproti zdravým tkáním (Calin a Croce, 2006).

První důkaz propojení miRNA a rakoviny se objevil při studiu tumor-supresorového genu v malém úseku na chromozomu 13q14 (Calin et al., 2002). Tento ~30 kb dlouhý úsek byl ztracen ve více než polovině případů výskytu chronické lymfocytární leukémie (CLL), což je nejčastější forma leukémie v západním světě (Calin et al., 2002, 2004a). Analýza prokázala lokaci 2 miRNA genů, *miR-15a* a *miR-16-1*, v kritickém úseku, které jsou negativně regulovány či ztraceny v 68% CLL (Calin et al., 2002, 2004b). Vzhledem k tomu, že delece genů *miR-15a* a *miR-16-1* koreluje s rozvojem neinvazivní formy CLL, byly tyto miRNA označeny za možné tumor-supresory CLL (Calin et al., 2005). Delece na tomto místě byla zjištěna také v rakovině prostaty, lymfomu z plášťových buněk a mnohočetném myelomu (Calin et al., 2002). Pacienti s touto delecí mají příznivější prognózu, než pacienti s abnormálními karyotypy či delecí na jiném chromozomu jako je 11q23 či 17q13, díky tomu, že homology genů *miR-15a* a *miR-16-1*, *miR-15b* a *miR16-2*, nacházející se na chromozomu 3 se při CLL v malé míře exprimují (Weng et al., 2011).

MiRNA je různě exprimována v normální, zdravé tkáni a buňkách a v rakovinných buňkách, což umožňuje rozeznat i málo diferenciované nádory (Volinia et al., 2006). Exprese miRNA se může lišit i v různých subtypech rakovinných buněk jako u rakoviny prsu (Sempere et al., 2007).

3.1 Mechanismy změn miRNA

Existuje několik mechanismů, kterými je možno docílit změn miRNA. V zásadě můžeme tyto mechanismy rozdělit do 4 skupin na genetické změny, změny regulace transkripčních faktorů,

epigenetické změny a změny v biogenezi miRNA (Croce, 2009; Esquela-Kerscher a Slack, 2006; Farazi et al., 2011; Iorio a Croce, 2012).

3.1.1 Genetické změny

Genetické změny můžeme rozdělit na změny chromozomální povahy, polymorfismus a mutace (Iorio a Croce, 2012). Mnoho miRNA genů v různých typech nádorů je lokalizováno na fragilních místech v chromozomu, které jsou náchylné k amplifikaci, translokaci či deleci (Calin et al., 2004a, 2004b).

Již zde bylo uvedeno, že první propojení rakoviny a miRNA bylo díky deleci na chromozomu 13q14 obsahujícím geny *miR-15a*, *miR-16-1* u víc jak poloviny pacientů trpících CLL (Esquela-Kerscher a Slack, 2006). Dalším příkladem delece je gen *miR-125b-1*, sekvenčně podobný genu *lin-4* *Caenorhabditis elegans* (Lagos-Quintana et al., 2002), umístěný ve fragilním místě chromozomu 11q24, který podléhá deleci u části pacientů s rakovinou prsu, ledvin, vaječníků a rakoviny děložního čípku (Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

Translokace stejně jako amplifikace bývá často spojena s delecí části chromozomu (Esquela-Kerscher a Slack, 2006; Huse et al., 2009). Při t(8;17) translokaci *Myc* onkogenu do lokusu *miR-142* je *Myc* umístěn po směru vlásenkové sekvence a pod kontrolu miRNA promotoru (Lagos-Quintana et al., 2002), což vede k vytvoření agresivní B-buněčné leukémie (Calin et al., 2004b). Ztráta asi 20nt dlouhé konzervativní sekvence při translokaci vede k narušení procesů miRNA, zvýšení exprese MYC a transformaci B buněk (Esquela-Kerscher a Slack, 2006). Příkladem amplifikace může být amplifikace lokusu *miR-26a* na chromozomu 12q v gliomech, která vede ke zvýšení jeho exprese a negativní regulaci exprese tumor-supresorového genu *Pten*. Tato amplifikace často koreluje s delecí druhé *Pten* alely a naopak se nevyskytuje při párové deleci či mutaci *Pten* (Huse et al., 2009).

Dalšími genetickými změnami miRNA jsou mutace a polymorfismus. V dědičných rakovinách prsu a CLL byly nalezeny zděděné mutace či jednonukleotidový polymorfismus (SNP) primárního transkriptu *miR-15a* a *hsa-mir-16-1*, které způsobují sníženou expresi těchto tumor-supresorových genů (Calin et al., 2005; Hu et al., 2008). Dále například SNP ve vazebném místě *let-7* zvyšuje riziko tvorby nemalobuněčného karcinomu plic (Chin et al., 2008).

3.1.2 Epigenetické změny

Epigenetické změny v miRNA mohou vést až k negativní regulaci exprese miRNA a podpory rakovinového bujení (Croce, 2009). Více jak polovina změn v DNA metylacích se týká metylace cytosinu v dinukleotidu CpG, tzv. CpG míst (CpG islands) (Weber et al., 2007), které jsou také nejvíce prostudovanou epigenetickou změnou (Croce, 2009).

Příkladem takovéto miRNA je *miR-127*, která je lokalizována v CpG místě miRNA clusteru imprintovaného genu na chromozomu 12 u myši, u člověka je součástí clusteru společně s dalšími

miRNA na chromosomu 14q32.31. MiR-127 negativně reguluje expresi protoonkogenu BCL6 (Saito et al., 2006). V nádorech močového měchýře je *miR-127* negativně regulována hypermetylací CpG míst na svém promotoru (Croce, 2009). K hypermetylaci CpG míst dochází i v *miR-124* u primárních kolorektálních tumorů, kdy umlčení této miRNA způsobí zvýšenou expresi onkogenu CDK6. Na rozdíl od *let-7a-3*, kde dochází k hypometylaci CpG míst při adenokarcinomu plic, což vede k deregulaci skoro 200 genů, z nichž se některé účastní regulace proliferace a diferenciace (Weber et al., 2007).

Metylace CpG míst není jediná možná epigenetická změna, mezi další patří třeba inhibice histon-deacetylázy v linii karcinomu prsu (Scott et al., 2006).

Epigenetické změny způsobené metylací mohou být terapeuticky opraveny podáním epigenetických hypometylačních či hypermetylačních látek, které navrátí hladinu metylace do původního stavu (Weber et al., 2007).

3.1.2.1 Regulace epigenetických změn

MiRNA nemusí být pouze obětí epigenetických změn, ale může je samo regulovat pomocí enzymů zapojených v těchto mechanismech, což vytváří vysoce komplexní zpětnou vazbu (Iorio a Croce, 2012).

Zástupci z rodiny *miR-29* genů, které jsou negativně regulovány v karcinomu plic, negativně regulují expresi enzymů DNA-metyltransferázy 3A a 3B (DNMT3A, DNMT3B), jež mají zvýšenou expresi v karcinomu plic. Pokud je terapeuticky zesílena exprese miR-29, dochází k navrácení původního stavu metylace, obnovení exprese tumor-supresorových genů a utlumí se tumorigeneze (Fabbri et al., 2007).

3.1.3 Deregulace transkripčních faktorů

Genetické a epigenetické změny v miRNA vedou k deregulaci transkripčních faktorů, které následně ovlivňují expresi miRNA, což může vyústit až v podporu transformace maligních buněk (Croce, 2009). Mezi nejznámější transkripční faktory, které slouží jako onkogeny patří MYC, RAS či supresor tumoru p53 (Farazi et al., 2011).

MYC protein je onkogenní transkripční faktor, který reguluje růst buněk a je schopen indukovat jak proliferaci, tak apoptózu. Proliferační signály vedou k aktivaci MYC, který mezi jinými indukuje expresi clusteru mir-17-92 a váže se na intron genu *C13orf25*, čímž přímo reguluje miR-17-92 transkript pri-miRNA. MiR-17-92 může působit jako supresor tumoru nebo onkogen v závislosti na tom, v jaké tkáni je exprimován (Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

RAS protein patří mezi membránou asociované GTPázové signalizační proteiny, které regulují buněčný růst a diferenciaci. Často jsou obětí nádorové genetické mutace, která vede k deregulaci mechanismu (Esquela-Kerscher a Slack, 2006). RAS indukuje expresi miR-21, která negativně reguluje expresi supresorů tumoru PTEN a apoptózy (Garzon et al., 2010).

Expresi miR-34 indukuje transkripční faktor p53, který se váže na promotory *miR-34* (Ceppi a Peter, 2014). MiR-34 může zprostředkovat některé z biologických účinků transkripčního faktoru p53, jako je například apoptóza. Ztráta miR-34 v některých nádorech, jako je karcinom pankreatu, vede k zeslabení apoptózy a podpoře tumorigeneze (Chang et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007).

3.1.4 Změny v biogenezi miRNA

Komponenty biogeneze miRNA mohou být mutovány či chybně exprimovány. Post-transkripční regulace miRNA může pozměnit cílové vázání miRNA, biogenezi nebo stabilitu miRNA, což vede ke zvýšenému riziku rakoviny či zhoršené odpovědi na její léčbu (Ryan et al., 2010).

Globální represe biogeneze miRNA pomocí umlčení 3 různých komponentů miRNA biogeneze (Dicer1, Drosha a DGCR8) vede ke snížení exprese miRNA a podporuje transformaci do rakovinných buněk a vytvoření tumoru (Kumar et al., 2007).

Změny v Diceru mohou negativně ovlivnit miRNA biogenezi a snížit expresi miRNA. *Dicer1* funguje jako haploinsuficientní tumor-supresorový gen (Kumar et al., 2009) tzn., že k pozitivní regulaci tumorigeneze stačí delece jedné jeho alely (Santarosa a Ashworth, 2004). Delece obou alel *Diceru1* vede k inhibici tumorigeneze. Delece *Diceru1* se vyskytuje například v karcinomu plic, ledvin či rakovině prsu (Kumar et al., 2009). Další příkladem tumorigenní regulace Diceru je mutace genu *Tarbp2* v některých tumorech tlustého střeva a žaludku s mikrosatelitní nestabilitou. *Tarbp2* kóduje TRBP komponent Diceru1, která negativně reguluje expresi TRBP, destabilizuje protein Dicer1 a způsobuje poruchu miRNA biogeneze (Melo et al., 2009).

Změnu v miRNA biogenezi může způsobit i transkripční faktor p53 sloužící jako supresor tumoru, který interaguje s komplexem Drosha, konkrétně s RNA helikázou p68, čímž ulehčuje vývoj primárního miRNA transkriptu na prekurzor miRNA. Mutace p53 negativně reguluje asociaci pri-miRNA s Droshou a RNA helikázou, v důsledku toho dochází k poklesu exprese miRNA (Suzuki et al., 2009).

Negativní regulace transportéru Exp5 způsobí snížení hladiny miRNA zablokováním přenosu pre-miRNA z jádra do cytoplasmy (Lund et al., 2004). Exp5 je negativně regulován v bronchoalveolárním karcinomu plic (Chiosea et al., 2007) a pozitivně regulován v rakovině prostaty (Chiosea et al., 2006).

3.2 Role miRNA v tumorigenezi

Již jsme se dozvěděli, že miRNA hraje důležitou roli v onkogenezi, během níž dochází k signifikantním změnám exprese miRNA, z nich některé příklady tu byly ukázány a vysvětleny. Bylo z nich zřejmé, že miRNA může hrát roli jako supresor tumoru i jako onkogen (Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

Příkladem již uvedených miRNA působících jako supresory tumoru jsou let-7, miR-15a, miR-16-1, miR-29, miR-34, miR-124, miR-125b-1, miR-127. Mezi další tumor-supresorové miRNA patří

například miR-353. Tato miRNA reguluje sadu genů s možným metastazujícím potenciálem a tvoří tak bariéru pro vznik metastáz. Negativní regulace miR-353 se objevuje metastázách karcinomu plic, rakoviny prsu či sekundárních metastázách v kostech (Tavazoie et al., 2008).

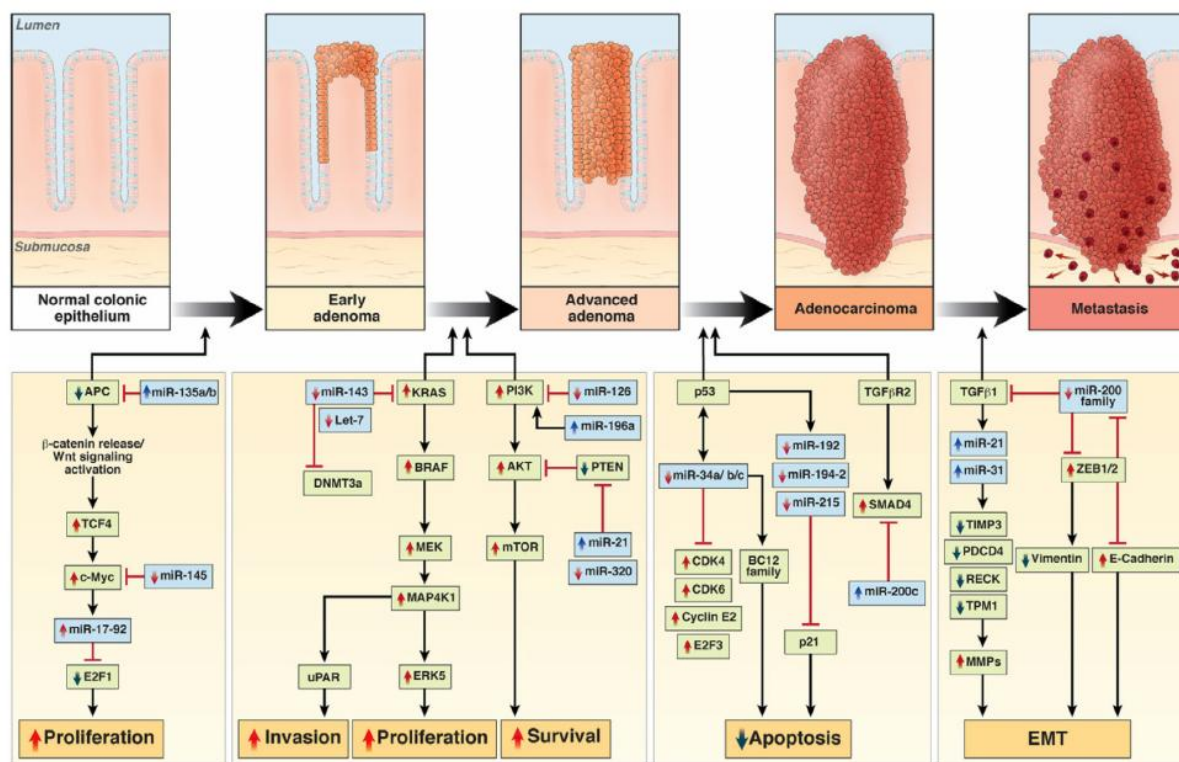
Mezi uvedené miRNA účinkující jako onkogeny patří miR-21 a miR-26a. Jedním z nejprozkoumanějších miRNA působících jako onkogen solidních nádorů je miR-155. MiR-155 indukuje proliferaci buněk a tvorbu lymfomů. Exprese miR-155 je zvýšená u agresivní formy CLL, Hodgkinsova a Burkittova lymfomu, rakoviny prsu, plic a tlustého střeva (Costinean et al., 2006; Eis et al., 2005). Jiné miRNA s onkogenetickým potenciónem miR-372 a miR-373 umožňují proliferaci a tumorigenezi primárních buněk. Také podporují tumorigenní růst pomocí utlumení p53 zprostředkované CDK inhibice v tumorech varlat (Voorhoeve et al., 2006). Dalším miRNA onkogenem je miR-10b. Tato miRNA, která pozitivně reguluje migraci buněk a jejich invazi, má zvýšenou hladinu v metastazované rakovině prsu. Zvýšená exprese miR-10b v ještě nemetastazovaném tumoru prsu vede k iniciaci metastáze a buněčné invaze (Ma et al., 2007, 2010a).

Existují i miRNA, které mohou působit buď jako supresory tumoru, či jako onkogeny v závislosti na tkáni, v jaké jsou exprimovány, a buněčném typu (Croce, 2009). Příkladem takových miRNA jsou miR-221 a miR-222. Tyto miRNA působí jako supresory tumoru u erytroblastické leukémie, protože iniciují proliferaci erytroblastů pomocí navázání na c-kit receptor SCF (Felli et al., 2005). Typičtější je role miR-221/222 jako onkogenů, kdy podporují buněčnou proliferaci, angiogenezi a tvorbu lymfomů. Cluster miR-221/222 je pozitivně regulovaný v agresivní CLL, karcinomu štítné žlázy, plic, jater a hepatocelulárním karcinomu (Garofalo et al., 2009; Poliseno et al., 2006). Další miRNA s dvojitým vlivem je miR-205. MiR-205 má tumor-supresorový vliv na karcinom prostaty. MiR-205 negativně reguluje migraci buněk a epiteliálně-mezenchymální transport pomocí inhibice proteinkinázy C (Gandellini et al., 2009). Jako onkogen působí miR-205 v epiteliálním karcinomu vaječníku, kde je pozitivně regulována pomocí DNA hypometylace (Iorio et al., 2007).

4 MiRNA v kolorektálním karcinomu

Ve světovém porovnání z roku 2012 je kolorektální karcinom (CRC) třetí nejčastější formou rakoviny u mužů a druhou u žen (v ČR 2. pro obě pohlaví) s odhadovanou incidencí 1 361 milionů případů za rok a mortalitou skoro 700 000 (Ferlay et al., 2013). Nedědičná forma kolorektálního karcinomu se vyvíjí postupně od benigního polypu, přes adenom (benigní tumor) až k malignímu adenokarcinomu a jeho metastázám (Fearon a Vogelstein, 1990; Lieberman, 2010). V těchto fázích prochází buňky tumorigenní transformací, která je spojena jak s fyziologickými, tak s genetickými a epigenetickými změnami spjatými s expresí miRNA. Jednotlivá stádia CRC jsou definovaná tzv. TNM

systémem podle hloubky invaze do stěny střeva, zapojení lymfoidních nodů a rozšíření invaze (Obrázek 4.1.) (Wolpin a Mayer, 2008).



Obrázek 4.1. MiRNA regulující signální dráhy v různých stádiích kolorektálního karcinomu. Na obrázku vidíme schéma Wnt/β-kateninové, KRAS, PI3K/AKT, p53 a TGF-β signální dráhy, které ovlivňují procesy proliferace, apoptózy, invaze a epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT). Převzato z Goel and Boland, 2012.

4.1 Raná fáze CRC/Aktivace Wnt/β-kateninové dráhy

V raném stádiu CRC hraje klíčovou roli aktivace Wnt/β-kateninové dráhy (Obrázek 4.1.), která aktivuje transkripci genů a tím indukuje proliferaci buněk (Reguart et al., 2005). Volný β-katenin stimuluje tuto signální dráhu navázáním na TCF/LEF transkripční faktory. Tomu zabraňuje APC (adenomatous polyposis coli) protein, vyvázáním volného β-kateninu z cytoplasmy (Nagel et al., 2008). Wnt/β-kateninová dráha také ovlivňuje migraci, diferenciaci, polaritu buněk a angiogenezi (Eisenmann, 2005).

Většina (60%) kolorektálních adenomů i karcinomů má inaktivovaný protein APC. K inaktivaci dochází již v raných stádiích adenomů a v dalších fázích CRC se hladina APC nemění, což poukazuje na důležitost umlčení APC v počátcích CRC. Častou formou inaktivace je mutace v genu *Apc* (Powell et al., 1992). Jinou možností umlčení APC je zvýšená exprese miR-135a a miR-135b, které inhibují expresi APC navázáním na 3'UTR *Apc* mRNA (Nagel et al., 2008). Dalšími možnými miRNA regulující APC jsou miR-141 a miR-142-3p, u nichž byla prokázána zvýšená exprese v CRC a jejich odhadovaným cílem je právě *Apc* (Bandrés et al., 2006).

B-katenin je vázán v membráně pomocí E-kadherinu. Negativní regulace E-kadherinu způsobí zvýšení hladiny volného β -kateninu v cytoplasmě a aktivaci Wnt/ β -kateninové dráhy. Vazba miR-9 na mRNA kódující E-kadherin způsobuje snížení jeho exprese. V kolorektálním karcinomu je zvýšené množství miR-9 díky jeho indukci onkogenem MYC (Ma et al., 2010b).

Další miRNA se změněnou expresí spojenou s Wnt/ β -kateninovou drahou je TCF indukovaná zvýšená exprese miR-21 (Lan et al., 2012) a snížená exprese miR-34. MiR-34 potlačuje Wnt/ β -kateninovou dráhu navázáním na *Wnt1*, *Wnt3*, *Axin2*, gen pro β -katenin, nebo *Lef1* (Cha et al., 2012).

4.2 Pokročilé stádium CRC/ Zabezpečení proliferace a vyhnutí se apoptóze

V další fázi CRC je vazbou dimeru aktivován receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) patřící mezi receptor tyrosinkinázy a je potlačena apoptóza. EGFR aktivuje 2 rozdílné signální dráhy, KRAS a PI3K/AKT (Mlcochova et al., 2013).

4.2.1 KRAS signální dráha

Signální dráha KRAS reguluje množství transkripčních faktorů, které ovlivňují proliferaci buněk, přežití a angiogenezi nádoru a jeho invazi (Obrázek 4.1.). Je to MAP-kinázová kaskáda složená z řetězce KRAS, BRAF, MEK, ERK a jednoho z transkripčních faktorů (Chen et al., 2009; Pagliuca et al., 2013).

Mezi nejdůležitější regulátory KRAS signální dráhy patří miR-143 a miR-145. Tyto miRNA zasahující jako tumor-supresory cílí mimo jiné na *Kras*, *Braf*, *Erk*, *Klf5*, *Stat1*, *E2f3* a *Cd44* (Chen et al., 2009; Pagliuca et al., 2013) a jsou radikálně sníženy v CRC (Akao et al., 2006). Primární transkripty těchto miRNA (pri-miR-143/145) jsou negativně regulované transkripčním faktorem RREB1, který je aktivovaný KRAS signální drahou (Kent et al., 2013). MiR-143/145 převážně regulují proliferaci, růst buněk a apoptózu spjatou s p53 signální drahou, ale zasahují také do regulace buněčného cyklu, migrace buněk a chemorezistence (Pagliuca et al., 2013; Zhu et al., 2011).

Expresi proteinu KRAS je také regulována miRNA let-7. Let-7 způsobuje translační represi *Kras* mRNA, jejímž důsledkem je snížení hladiny KRAS a utlumení růstu buněk (Graziano et al., 2010). Obranným mechanismem nádoru proti vlivu let-7 může být SNP ve vazebném místě let-7 na 3'UTR *Kras*, která vede k necitlivosti *Kras* na let-7a (Vickers et al., 2012).

Protein KRAS může sám regulovat miRNA. V CRC KRAS protein indukuje expresi onkogenních miRNA miR-181a, miR-200c a miR-221/222 (Ota et al., 2012). Expresi miR-181a se v normální kolorektální tkáni a nádorové tkáni signifikantně neliší. Vysoká exprese miR-181a potlačuje expresi tumor-supresoru PTEN, čímž ovlivňuje prognózu CRC k horšímu. PTEN hraje roli v apoptóze, migraci a metastázi buněk (Nishimura et al., 2012).

Další miRNA hrající roli v proliferaci jsou miR-129 a miR-1, které negativně regulují ERK1/2. Kromě zapojení v KRAS signalizační dráze miR-129 brání proliferaci přes regulaci buněčného cyklu, kdy inhibicí exprese CDK6 zastaví buňku v G1 fázi buněčného cyklu, což vede k její buněčné smrti (Wu et al., 2010). MiR-1 ovlivňuje ERK1/2 nepřímo pomocí onkogenu MET, který je schopen aktivovat ERK1/2. Snížená hladina miR-1 v CRC vede ke zvýšení hladiny MET, aktivaci ERK1/2 a podpoře proliferace buněk (Reid et al., 2012).

Mezi transkripční receptory aktivované KRAS signální drahou patří např. MYC, STAT1, NK- κ B, FLI, TCF, PEA3, YES a FOS (Bakirtzi et al., 2011; Bandrés et al., 2006). Transkripční faktor NF- κ B stimuluje expresi miR-21 a miR-155, které negativně regulují PTEN a SOCS1 a indukují růst nádoru (Bakirtzi et al., 2011). MYC regulují miR-27a, let-7a, miR-145 (Mlcochova et al., 2013).

4.2.2 PI3K/AKT signalizační dráha

Druhou dráhou aktivovanou EGFR je PI3K/AKT signalizační dráha. Je to kaskádovitá signalizační dráha složená z kináz PI3K, AKT, mTOR a jeho efektorů (Obrázek 4.1.). Negativně reguluje apoptózu a pozitivně proliferaci buněk, migraci a angiogenezi (Mlcochova et al., 2013).

Jednou z důležitých miRNA rapidně redukovaných v CRC a regulujících PI3K signalizační dráhu je miR-126. MiR-126 snižuje expresi regulační podjednotky p85 β , která stabilizuje signál PI3K, což vede ke snížení hladiny fosforylovaného AKT a utlumení PI3K/AKT dráhy (Guo et al., 2008). Na potlačení PI3K/AKT signalizační dráhy se podílí i miR-30, která reguluje jinou podjednotku PI3K, PIK3CD. V CRC byla detekována snížená míra exprese miR-30 (Liao et al., 2014; Zhong et al., 2013).

Další miRNA zapojené do PI3K signalizační dráhy jsou miR-19, miR-21, miR-26a a miR-181a inhibující tumor-supresor PTEN (Meng et al., 2007; Nishimura et al., 2012; Olive et al., 2009). Vazba miR-21 na *Pten* mRNA tlumí pomocí translační represe expresi PTEN, jež potlačuje funkci PI3K (Meng et al., 2007). MiR-21 negativně reguluje kromě PTEN také PDCD4 a BCL2, což vede k zvýšené proliferaci, zastavení apoptózy a invazi buněk. Míra zvýšení exprese miR-21 v CRC pozitivně koreluje s vývojovými stádii CRC. (Shibuya et al., 2010; Xiong et al., 2013). MiR-21 s miR-155 mohou být aktivované neoteninem a pozitivně regulovat přes vazbu 3'UTR *Ppp2ca* mRNA zvýšenou expresi AKT v PI3K/AKT (Bakirtzi et al., 2011). Zvýšená hladina exprese miR-26a v CRC vede k podpoře proliferace a potlačení apoptózy, pravděpodobně pomocí vazby miR-26a na 3'UTR *Pten* mRNA a *Ccnd1* (cyklin D1), regulační podjednotku CDK4 a CDK6 (Huse et al., 2009; Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2013).

AKT je negativně regulována transkripčním faktorem FOXO ovlivňujícím zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a apoptózu. MiR-96, miR-182 a miR-183 potlačují expresi FOXO a v CRC byly opakovaně zaznamenány jejich zvýšené hladiny (Guo et al., 2008; Myatt et al., 2010; Xu et al., 2012).

4.2.3 p53 signalizační dráha

Tumor-supresorový transkripční faktor p53 je centrální složkou regulačního mechanismu buňky koordinující odpověď buňky na buněčný stres nebo poškození buňky (Obrázek 4.1.). Aktivace p53 může být způsobena například poškozením DNA, deplecí telomeráz, aktivací onkogenů, zvýšenou expresí cytokinů či hypoxickým prostředím. Aktivace p53 signální dráhy zabrání degradaci p53, jeho stabilizaci a zvýšení exprese (Vogelstein et al., 2000).

Většina tumorů, včetně CRC, má inaktivovaný protein p53 (Vogelstein et al., 2000). Mutace p53 se objevuje u více jak 50% CRC (López et al., 2012).

Protein p53 aktivuje expresi rodiny miR-34, která se skládá z miR-34a, miR-34b a miR-34c (Corney et al., 2007). Na gen kódující pri-miR-34a se komplementárně váže protein p53 a aktivuje tak jeho transkripci (Raver-Shapira et al., 2007). Ektopická exprese miR-34a vede k negativní regulaci stovek mRNA, které indukují zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, senescenci a apoptózu (Chang et al., 2007; Lodygin et al., 2008). Mezi miR-34a regulované mRNA patří geny *Sirt1*, *Cdk4*, *Cdk6*, *Ccne2* a *E2f3* (Lodygin et al., 2008; Tazawa et al., 2007). SIRT1 patří mezi NAD-dependentní deacetylázy, které regulují p53. Deacetylace p53 způsobuje snížení schopnosti p53 se vázat (Yamakuchi et al., 2008). U mnoha typů tumorů, včetně CRC, dochází k snížené expresi miR-34a. Jedním ze způsobů umlčení miR-34a je delece na chromosomu 1p36, kde je *miR-34a* lokalizována. Tato delece byla pozorována v 50% primárních karcinomů a 64% metastáz. Pravděpodobnost výskytu delece *miR-34a* se snižuje s výskytem mutace p53 (Thorstensen et al., 2000). Dalším způsobem potlačení miR-34a je metylace CpG míst jejího promotoru (v CRC kolem 13%) (Lodygin et al., 2008). MiR-34b a miR-34c negativně regulují geny kódující *δ-like 1*, *Notch1*, *Met*, a *Myc*. Navíc miR-34b inhibuje expresi *Cdk6* a miR-34c *E2f3*, *Bcl2*, a *Ccnd1* (Cannell a Bushell, 2010; Corney et al., 2007). Mir-34b/c jsou často epigeneticky umlčeny pomocí hypermetylace CpG míst v CRC (Toyota et al., 2008).

Protein p53 indukuje expresi ještě minimálně 4 miRNA, miR-16, miR-192, miR-194 a miR-215, všechny mají sníženou expresi v CRC. MiR-192 a miR-215 se podílejí na zvýšení hladiny p21, zástavě buněčného cyklu, indukci apoptózy. Jejich efekt je ale pravděpodobně menší než efekt miR-34 (Braun et al., 2008). Ke změnám exprese miR-194-2 může přispět výskyt SNP v jejím prekurzoru (Duan et al., 2007). MiR-16 se účastní negativní regulace cyklinu D1 a CDK6, čímž stimuluje apoptózu, a zároveň zpětně inhibuje expresi transkripčního faktoru p53 (Ma et al., 2013).

Samotnou apoptózu ovlivňuje například miR-195 a miR-181, jejíž snížená exprese byla detekována v CRC. MiR-195 a miR-181 pozitivně regulují indukci buněčné apoptózy pomocí vazby na 3'UTR *Bcl2* mRNA anti-apoptického faktoru BCL2 (Chen et al., 2010; Liu et al., 2010).

4.3 Pozdní stádium CRC a metastáze / Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný růst, angiogeneze, neomezený replikační potenciál, invazita a metastazování

4.3.1 TGF- β signalizační dráha

Signalizační dráha aktivovaná transformujícím růstovým faktorem β (TGF- β) usnadňuje metastázu v pokročilém stádiu CRC (Obrázek 4.1.) (Louafi et al., 2010). TGF- β navázáním na TGF- β receptor II (TGF- β RII) aktivuje tvorbu komplexu TGF- β receptorů I a II. TGF- β RII aktivuje TGF- β RI, který fosforyluje SMAD2 a SMAD3. Fosforylovaný komplex SMAD2/3 navazuje SMAD4 a putuje do jádra, kde asociuje se SMAD vazebnými komponenty, které regulují transkripční faktory řídící translační indukci či represi některého z genů (Massagué a Wotton, 2000). TGF- β signalizační dráha indukuje epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT) a reguluje migraci, invazi buněk, angiogenezi i imunosupresi (Kong et al., 2008).

Do negativní regulace TGF- β signální dráhy je zapojen cluster miR-17-92, jehož hladina exprese primárního transkriptu inverzně koreluje s mírou TGF- β indukovaných genů s výjimkou genů cílených miR-17-92 (Dews et al., 2010). Cluster miR-17-92 pozitivně regulovaný transkripčním faktorem MYC je tvořen šesti miRNA, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20 a miR-92a-1 (Ji et al., 2011). MiR-17-5p a miR-20 limituje množství TGF- β RII a miR-18 utlumuje expresi SMAD4 (Dews et al., 2010). SMAD2 je redukován pomocí vazby miR-155 na 3'UTR *Smad2* mRNA. Protože SMAD proteiny regulují řadu genů, miR-155 ovlivňuje odpověď myeloidních buněk na TGF- β signalizační dráhu, což má vliv hlavně na fibrózu, angiogenezi a imunitní odpověď buněk (Louafi et al., 2010). V CRC byla detekována zvýšená hladina jak miR-17-5p a miR-20, tak miR-155 (Dews et al., 2010; Volinia et al., 2006). Kromě těchto miRNA byly vytipovány podle komplementarity genové vazby ještě let-7g, miR-219 s predikovanou vazbou na *Tgf β 2*, miR-200c s vazbou na SMAD2 a miR-372 s komplementaritou jak k *Tgf β 2*, tak k *Smad2*, všechny se zvýšenou expresí v CRC (Bandrés et al., 2006).

MiR-155 ovlivňuje mimo jiné genovou expresi spjatou s imunitním systémem a hraje důležitou roli v regulaci vývoje imunitních buněk, jejich funkce (O'Connell et al., 2009). Plazmacytoidní dendritické buňky (PDC) regulují expresi miR-155 a miR-155* pomocí produkce toll-like receptorů 7 (TLR-7). MiR-155/155* rozdílně regulují hladinu interferonu (IFN) I. typu produkovaném PDC. MiR-155 inhibuje expresi IFN α a IFN β z TLR navázáním na *Tab2* mRNA, miR-155* podporuje expresi IFN α / β supresí inhibitoru TLR IRAKM. MiR-155* je indukovaná v raných a miR-155 v pozdějších stádiích aktivace PDC (Zhou et al., 2010) MiR-155 se také podílí na regulaci imunitní odpovědi makrofágů na LPS (Androulidaki et al., 2009) a potlačuje expresi c-FOS, což je nutné k maturaci dendritických buněk a jejich schopnosti aktivovat antigen specifické T buňky (Dunand-Sauthier et al., 2011).

4.3.2 EMT

Mezníkem přechodu mezi adenomem a karcinomem je epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT), kdy se rozruší epiteliální těsné spoje, změní se buněčná adheze, dochází k remodelaci cytoskeletu, poklesu E-kadherinu, ztrátě apikální polarity a epiteliální buňky se změní na fibroblastoidální buňky schopné lokomoce. Tyto buňky dále aktivují proces simultánní degradace a syntézy de novo extracelulárního matrixu (ECM). Ztráta epiteliální buněčné adheze a cytoskeletárních komponentů je souběžně nahrazena mezenchymálními komponenty a iniciací migrace (Kong et al., 2008; Zavadil a Böttinger, 2005).

Klíčovým komponentem EMT je ZEB1/2 (Obrázek 4.1.). MiR-200 inhibuje expresi ZEB1, ETS1 a FLT1, což vede ke snížení E-kadherinu. Represe miR-200 vede k aktivaci ZEB1 (Ono et al., 2012). Na buňkách rakoviny prsu bylo zjištěno, že miR-155 redukuje protein RHOA, čímž naruší těsné spoje tkání a indukuje buněčnou migraci a invazi (Kong et al., 2008). MiR-191 a miR-21 se váží na 3'UTR *Timp3* mRNA. TIMP3 inhibuje metaloproteinázu 3 (MMP3) zapojenou v procesu degradace ECM (Qin et al., 2014; Xiong et al., 2013). V CRC je zvýšená exprese miR-191 i miR-21 (Volinia et al., 2006).

Expresí transkripčního faktoru ZEB2, který inhibuje expresi E-kadherinu během EMT, je negativně regulována miR-132, jeho vazbou na 3'UTR *Zeb2* in vitro (You et al., 2014). Mezi dalšími předpokládanými cíli miR-132 je *Pdgfra* a u miR-132* jsou to *Ccne1* a *Cdk4* (Haller et al., 2010). V CRC byla, podobně jako v rakovině plic, detekována snížená exprese miR-132/miR-132* (Haller et al., 2010; You et al., 2014), ale existuje i microarrays studie, která udává mírné zvýšení exprese miR-132 (Volinia et al., 2006).

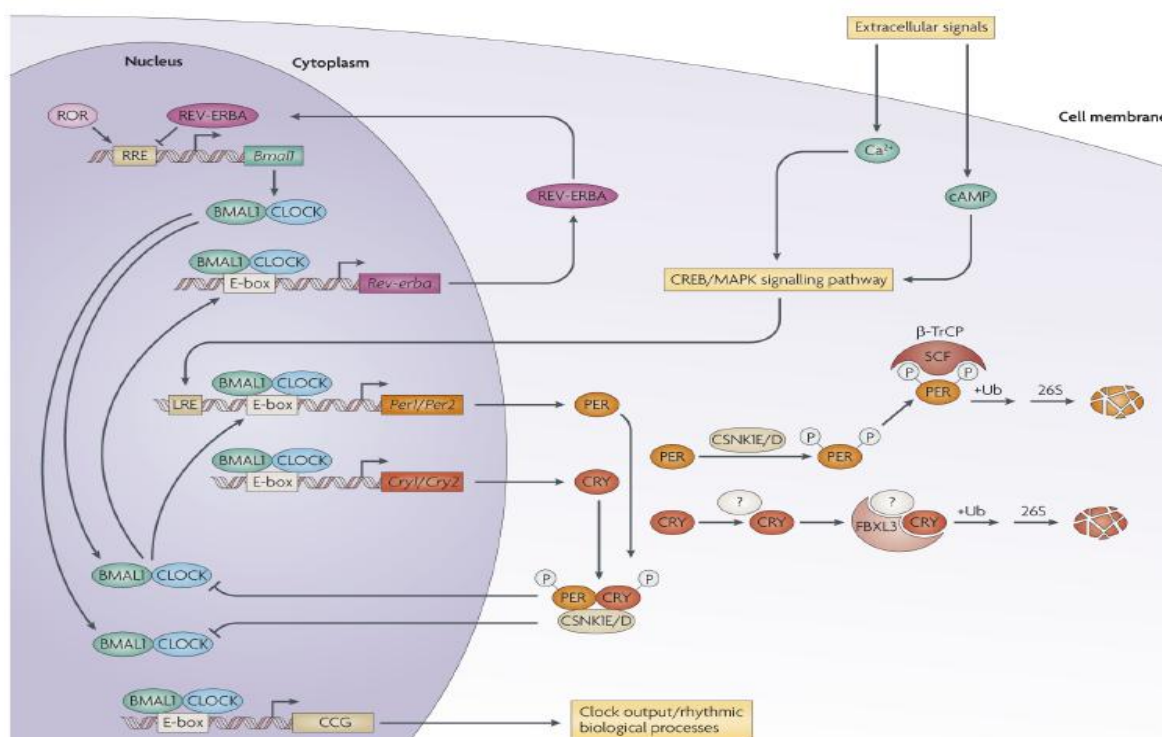
5 MiRNA a regulace cirkadiánních rytmtů

Většina organismů generuje svůj vnitřní čas, tzv. cirkadiánní hodiny (CC). Rotace Země způsobuje periodické změny světla a teploty ve vnějším prostředí, které dokážou seřadit, resetovat vnitřní čas organismu. Cirkadiánní hodiny vytvářejí cirkadiánní rytmus s periodou ~24h, který synchronizuje procesy v těle a umožňuje se na předvídatelné změny připravit (Golombek a Rosenstein, 2010).

Cirkadiánní hodiny (CC) u savců jsou tvořeny systémem hierarchických oscilací, na jehož vrcholu stojí suprachiasmatické jádro (SCN) (Reppert a Weaver, 2002). SCN je uloženo v přední části hypotalamu, koordinuje periferní hodiny a denně stimuluje resetování hodinové fáze jako odpověď na světelné signály přijímané retinou přes retino-hypotalamickou dráhu (Berson et al., 2002).

Savčí CC se skládají ze sítě autoregulačních pozitivních a negativních transkripčně-translačních zpětných vazeb působících na úrovni jednotlivých buněk (Obrázek 5.1.) (Kume et al., 1999). Mezi hlavní pozitivní komponenty patří transkripční faktory CLOCK a BMAL1. CLOCK a BMAL1 vytváří heterodimer vazbou svých bHLH-PAS domén. Heterodimer CLOCK:BMAL1 se váže na specifickou

sekvenci (E-box) v promotoru genů a tím aktivuje transkripci hodinami kontrolovaných genů, včetně genů negativní složky zpětné vazby *Per1*, *Per2*, *Cry1* a *Cry2* (Gekakis et al., 1998; Reppert a Weaver, 2002). Transkripty aktivovaných genů jsou periodicky transportovány do cytoplasmy, kde dochází k jejich translaci. Po čase překročí hladiny PER a CRY proteinů kritickou mez, navzájem zformují heterodimery PER:CRY, které jsou fosforylovány kaseinkínázou 1δ (CK1δ) nebo kaseinkínázou 1ε (CK1ε) (Ko a Takahashi, 2006). Fosforylované heterodimery PER:CRY jsou translokovány do jádra, kde inhibují aktivitu heterodimeru CLOCK:BMAL1 a tím svou vlastní transkripci (Kume et al., 1999). Další zpětnou vazbu tvoří proteiny REV-ERBα a RORα, jejichž transkripce je stimulována heterodimerem CLOCK:BMAL1. RORα a REV-ERBα spolu kompetitují o vazbu na *Bmal1* promotoru. RORα indukuje transkripci *Bmal1*, REV-ERBα ji inhibuje (Emery a Reppert, 2004; Preitner et al., 2002).



Obrázek 5.1. Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky tvořící cirkadiánní hodiny u savců. Převzato z Takahashi et al., 2008.

Produkty genů kontrolovaných hodinami ovlivňují řadu biochemických, fyziologických a behaviorálních procesů, mimo jiné regulují spánkový cyklus, teplotu těla, metabolismus, krevní tlak, syntézu hormonů, imunitní odpověď a jiné (Li et al., 2012; Richards a Gumz, 2013). Bylo prokázáno, že až 10% savčích transkriptů je regulováno CC (Paa et al., 2002). Narušení cirkadiánního rytmu může vést k řadě problémům jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, obezita, neurologické poruchy a poruchy spánkového cyklu (Li et al., 2012; Takahashi et al., 2008).

Další regulace CC jsou přes post-transkripční a post-translační modifikace jako je ubiquitinace, fosforylace, acetylace, metylace (Ko a Takahashi, 2006; Staiger a Köster, 2011). Jednou z možností post-transkripčních úprav je regulace CC miRNA.

Světlo stimuluje resetování CC pomocí aktivace řady molekulárních procesů, včetně těch zpětnovazebných, které po čase vedou k resetování fáze exprese. Jedním z takových procesů je i indukce transkripce *miR-132*. Světelný stimul aktivuje post-translační úpravy způsobující remodelaci chromatinu a expresi hodinami kontrolovaných genů. Mezi transkribovanými geny jsou i geny *Per1*, *Per2*, *Btg2*, *Paip2a* a *miR-132* (Alvarez-Saavedra et al., 2011). BTG2 a PAIP2 podporují degradaci *Per1/2* mRNA, na rozdíl od proteinu MECP2, který se váže na promotory *Per1* a *Per2* a aktivuje tak jejich transkripci. PAIP2a navíc kompetuje o vazebné místo na polyA konci transkriptů s proteinem PABP, čímž zpomaluje proces translace. MiR-132 potlačuje transkripci genů účastnících se remodelace chromatinu (*Mecp2*, *Ep300*, *Jarid1a*) a translace proteinů (*Btg2*, *Paip2a*). Zvýšená hladina miR-132 tedy vede ke snížení hladiny PER proteinů, zastavení remodelace chromatinu a tím i k oslabení resetování CC a nastolení homeostáze (Alvarez-Saavedra et al., 2011; Cheng et al., 2007).

Světelný stimul indukuje cirkadiánní expresi miR-132 nepřímo. Světlem aktivovaná MAPK signalizační dráha stimuluje CREB protein, který indukuje transkripci *miR-132* pomocí vazby na specifický CRE vazebný motiv (Cheng et al., 2007). MiR-132 společně s miR-219 ovlivňují také neuronální dráždivost. MiR-132 posiluje neuronální dráždivost, miR-219 ji inhibuje. Exprese miR-219 je regulována heterodimerem CLOCK:BMAL1 a její zvýšená míra aktivity zkracuje délku periody CC (Cheng a Obrietan, 2007; Cheng et al., 2007).

Cirkadiánní exprese miR-142-3p je regulována heterodimerem CLOCK:BMAL1. MiR-142-3p vytváří svým navázáním na 3'UTR *Bmal1* mRNA negativní zpětnou vazbu pro regulaci BMAL1 v SCN. Zvýšená exprese miR-142-3p potlačí cirkadiánní rytmus BMAL1 in vitro (Shende et al., 2013).

Příkladem jiné miRNA spjaté s regulací CC v SCN je miR-185. MiR-185 se váže na *Cry1* mRNA a translační represí ovlivňuje hladiny proteinu CRY1. Umlčení cirkadiánní exprese miR-185 zvýší amplitudu cirkadiánního rytmu CRY1 (Lee et al., 2013).

Další miRNA zapojená do regulace CC je miR-192 a miR-194. MiR-192 a miR-194 tvoří cluster miR-192/194, který se váže na 3'UTR *Per* mRNA a tím negativně reguluje expresi *Per* genů (*Per1*, *Per2*, *Per3*). Zvýšená exprese clusteru vede ke zkrácení periody CC (Nagel et al., 2009).

Příkladem miRNA nepřímo ovlivňující CC je miR-34, jež inhibuje expresi SIRT1. SIRT1 patří mezi NAD⁺ dependentní deacetylázy a účastní se regulace CC jak v SCN, tak v periferních tkáních potkana. SIRT1 se společně s PGC-1α váže na *Bmal1* promotor a tím indukuje jeho transkripci. Heterodimer CLOCK:BMAL1 zpětně reguluje aktivaci SIRT1 přes stimulaci transkripce enzymu *Nampt*, který je klíčovým faktorem pro tvorbu SIRT1 kofaktoru NAD⁺. SIRT1 také může deacetylovat BMAL1 nebo změnit stabilitu PER2. Pokles hladiny proteinu SIRT1 ve vyšším věku vede ke snížení hladiny BMAL1 a PER2 a k oslabení cirkadiánního rytmu, což může souviset s procesem stárnutí (Chang a Guarente, 2013; Yamakuchi, 2012).

Cirkadiánní rytmus v retině umožňuje fotoreceptorům adaptaci na denní předvídatelné změny světla v prostředí. Cirkadiánní proteiny CLOCK a CREB indukují expresi miR-26a in vitro. MiR-26a inhibuje translaci podjednotky $\alpha 1C$ fotoreceptorového napěťově řízeného vápenatého kanálu L-typu (L-VGCC $\alpha 1C$) v kuželovitých fotoreceptorech. Aktivita fotoreceptorů se odvíjí od cirkadiánního rytmu L-VGCC, který zprostředkovává vstup vápenatých iontů do fotoreceptoru a řídí tím uvolnění neurotransmiterů v retině (Shi et al., 2009).

V myší retině bylo detekovaných několik miRNA s cirkadiánní expresí, mezi nimi miR-96, miR-103, miR-106b, miR-124, miR-182 a miR-422a/b. MiR-96 a miR-182 jsou součástí clusteru miR-183/96/182, jež je exprimovaný ve fotoreceptorech a podílí se na regulaci diferenciaci retinálních promotorů a funkce retiny. Mezi odhadovaná vazebná místa clusteru miR-183/96/182 se řadí *Chx10*, *Olf1*, *Elk1*. MiR-96 a miR-182 jsou pravděpodobně regulovány proteiny ROR α 1/2, jejichž exprese je indukována heterodimerem CLOCK:BMAL1. Samy pak negativně regulují cirkadiánní expresi adenylcyklázy VI (ADCY6) a CLOCK proteinu (Xu et al., 2007).

Játra vykazují silný cirkadiánní rytmus buněčných a metabolických dějů související s koordinací příjmu potravy, jejím zpracováním a energetickým metabolismem (Panda et al., 2002). Periferní CC v myších játrech ovlivňují většinu metabolických drah, některé z nich přes miR-122. Transkripce *miR-122* je regulována transkripčním faktorem REV-ERB α . Samotná miR-122 nemá cirkadiánní expresi, ale pri-miR-122 a pre-miR-122 ji vykazují (Gatfield et al., 2009). MiR-122 negativně reguluje hladiny proteinů PPAR, SMARCD1/BAF60a a nokturninu (Gatfield et al., 2009; Kojima et al., 2010). Nokturnin je cirkadiánně kontrolovaná deadenyláza, která odstraňuje polyA konec z transkriptů mRNA a tím reguluje jejich expresi (Kojima et al., 2010). Utlumení miR-122 vede k deregulaci exprese stovek genů, z nichž většina souvisí s metabolismem cholesterolu a lipidů (Gatfield et al., 2009).

Jiné miRNA související s regulací periferních CC v myších játrech jsou miR-181d, miR-191, miR-328 a miR-383. Míra exprese miR-181d a miR-191 inverzně koreluje s hladinou exprese jejich komplementárních vazebných cílů, *Clock* a *Bmal1*. Překvapivá pozitivní korelace exprese byla detekována u miR-328 a miR-383 s jejich predikovanými cíli, *Per* a *Cry* (Na et al., 2009).

V jejunu potkana byly detekovány tři miRNA s cirkadiánní expresí, miR-16, miR-20a a miR-141. MiR-16 má cirkadiánní expresi v kryptách jejunu, přičemž podobný cirkadiánní rytmus proliferace buněk byl zaznamenán i v lidské gastrointestinální mukóze (Balakrishnan et al., 2010a; Buchi et al., 1991). MiR-16 inhibuje proliferaci enterocytů pomocí suprese translace proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu, cyklinu D1-3, cyklinu E1 a CDK6. Proliferace enterocytů umožňuje zvětšení slizničního povrchu jejunu před předvídatelným denním příjmem potravy. MiR-16 pravděpodobně koordinuje cirkadiánní rytmus proliferace enterocytů a tím míru schopnosti absorpce s dostupností živin dodávaných střevu (Balakrishnan et al., 2010b). MiR-16 společně s miR-1, miR-30, miR-155 a let-7

byly detekovány jako miRNA s komplementární vazbou na molekulární komponentu hodin *Ck1δ* (Selbach et al., 2008).

Existují ještě miRNA, u kterých byla bioinformaticky predikovaná cirkadiánní exprese, jsou to miR-9, miR-24, miR25, miR-26, miR-27, miR-29, miR-93, miR-211, miR-302 a miR-346. Cirkadiánní rytmus těchto miRNA musí být ještě experimentálně ověřen (Figueredo et al., 2013).

6 MiRNA v kolorektálním karcinomu spjaté s regulací cirkadiánních rytmtů

V řadě studií se poukazuje na práci na směny jako na rizikový faktor vedoucí k narušení cirkadiánních rytmtů a vzniku určitých typů rakoviny, mezi nimiž je i kolorektální karcinom (Hansen, 2006; Haus a Smolensky, 2006). Narušení mechanismu cirkadiánních hodin je spojené se stimulací vývoje kolorektálního karcinomu. V CRC byly detekovány narušené či úplně utlumené cirkadiánní rytmy hlavních cirkadiánních genů, *Bmal1*, *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* (Soták et al., 2013). Tyto geny úzce souvisí s regulací biochemických a fyziologických procesů, včetně regulace proliferace, apoptózy a buněčného cyklu, klíčovými procesy ve vývoji CRC (Soták et al., 2014). V uplynulých kapitolách jsme se již seznámili s rolí, jakou miRNA zastává v kolorektálním karcinomu i cirkadiánních rytmech. V posledních letech se objevily studie zabývající se propojením úlohy miRNA v cirkadiánních rytmech a v tumorigenezi. Například Li se svými kolegy poukázal na propojení mezi miR-124 regulovaným CLOCK proteinem v gliomu a vývojem lidského gliomu (Li et al., 2013). Některé ze zmiňovaných miRNA se účastní regulace obou těchto procesů.

Za pomoci databáze miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>; Dweep et al., 2011) jsem vybrala z databáze lidských miRNA ty, které hrají roli jak v regulaci genů cirkadiánních hodin, tak v kolorektálním karcinomu (konkrétní vybrané dráhy: CIRCADIAN_PATHWAY, CIRCADIAN_RHYTM, COLORECTAL_CANCER z databází KEGG a Biocarta; naposledy aktualizované 15.května 2011). Uvedené cílové geny byly experimentálně ověřené jako cíle specifických miRNA. Některé ověřené a predikované geny byly dodatečně přidány z literatury kvůli aktuálnosti dat z databáze miRWalk (viz Tabulka 6.1.).

Tabulka 6.1. – Identifikované miRNA, jejichž cílové geny se účastní vývoje CRC i regulace cirkadiánních hodin (data získaná z databáze miRWalk (Dweep et al., 2011))

Název miRNA	Dráha	Název genu	Pre-miRNA
hsa-let-7b/7b*	CRC	<i>Akt1/2; Bcl2; Braf; Ccnd1; Ctnnb1; Cyps; Egfr; Erk1; Grb2; Igf1r; Jun; Kras; Met; Myc; Pik3ca; Tgfβr3; Tgfβ1; Tgfβr2[#]; Tp53</i>	hsa-let-7b
	CC	<i>Ck1δ</i>	

hsa-miR-1	CRC	<i>Akt1; Apc; Araf; Bcl2; Birc5; Braf; Casp3; Ccnd1; Ctnnb1; Dvl2; Egfr; Fos; Jun; Met; Myc; Pik3ca; Tp53</i>	hsa-mir-1-1/2
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-132/132*	CRC	<i>Akt1; Erk1; Myc; Pdgfra; Rac1; Tgfβ1; Ccne1[#]; Cdk4[#]</i>	hsa-mir-132
	CC	<i>Bmal1; Clock; Per1; Per2^{**}; Paip2a^{**}; Btg2^{**}; MeCP2^{**}; Ep300^{**}; Jarid1a^{**}</i>	
hsa-miR-155/155*	CRC	<i>Akt1; Apc; Bax; Bcl2; Braf; Ccnd1; Ctnnb1; Egfr; Fos; Igfr; Jun; Kras; Erk1; Mapk8; Met; Mlh1; Msh2/6; Myc; Pik3ca; p85α; Smad2/4; Sos1; Tgfβ1/2; Tgfβr2; Tp53</i>	hsa-mir-155
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-16	CRC	<i>Akt1; Bad; Bcl2; Casp3; Ccnd1; Cdk6^{**}; Ctnnb1; Egfr; Jun; Kras; Mapk8; Met; Msh2; Myc; Pik3ca; Tp53</i>	hsa-mir-16-1/2
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-181d	CRC	<i>Bcl2; Smad4; Tgfβ1; Tgfβr1</i>	hsa-mir-181d
	CC	<i>Bmal1; Clock; Per1</i>	
hsa-miR-191/191*	CRC	<i>Braf; Tp53; Timp3^{**}</i>	hsa-mir-191
	CC	<i>Bmal1; Clock; Per1</i>	
hsa-miR-194	CRC	<i>Akt1; Ccnd1; Fzd6; Jun; Myc; Rac1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-194-1/2
	CC	<i>Bmal1; Clock; Per1^{**}; Per2^{**}; Per3^{**}</i>	
hsa-miR-26a	CRC	<i>Akt1; Ccnd1; Gsk3b; Jun; Mapk8; Myc; Pik3ca; Smad3; Tgfβ1/3; Tgfβr2; Pten[#]</i>	hsa-mir-26a-1/2
	CC	<i>Clock</i>	
hsa-miR-30a/30a*	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ctnnb1; Egfr; Jun; Met; Smad2; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-30a
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-30b/30b*	CRC	<i>Acvr1b; Akt1; Bcl2; Ccnd1; Ctnnb1; Egfr; Fos; Jun; Met; Myc; Smad2/3; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-30b
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-30c	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ctnnb1; Egfr; Jun; Met; Myc; Rac1; Smad2; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-30c-1/2
hsa-miR-30c-1*/2*	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ctnnb1; Egfr; Jun; Met; Smad2; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	
hsa-miR-30c/30c*	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-30d/30d*	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ctnnb1; Egfr; Jun; Met; Smad2; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-30d
	CC	<i>Ck1δ</i>	
hsa-miR-30e/30e*	CRC	<i>Acvr1b; Akt1; Bcl2; Ccnd1; Ctnnb1; Egfr; Jun; Met; Smad2; Tgfβ1; Tgfβr1/2; Tp53</i>	hsa-mir-30e
	CC	<i>Ck1δ</i>	

CC – cirkadiánní hodina
CRC – kolorektální karcinom

**přidaný ověřený gen
přidaný predikovaný gen

V literatuře jsem poté našla další miRNA, které jsou spjaté s regulací jak cirkadiánních rytmů, tak CRC. Spojením dat z kolorektální dráhy ověřených genů miRWalk (COLORECTAL_CANCER) a dostupné literatury jsem detekovala 10 miRNA, které souvisí s tumorigenezí CRC a regulací cirkadiánních rytmů. (viz Tabulka 6.2.)

Tabulka 6.2. – Identifikované miRNA, jejichž cílové geny se účastní vývoje CRC i regulace cirkadiánních hodin (data získaná z databáze miRWalk (Dweep et al., 2011) a literatury)

Název miRNA	Dráha	Název genu	Pre-miRNA
miR-9	CRC	<i>Myc; Cdh1</i>	hsa-mir-9-1/2/3
	CC	~	
miR-20a	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ccnd1; Egfr; Jun; Kras; Met; Myc; Tgfβ1; Tgfβr2; Tp53</i>	hsa-mir-20a
	CC	~~	
miR-27a	CRC	<i>Akt1; Bcl2; Ccnd1; Egfr; Igfr; Met; Pik3ca; Tp53</i>	hsa-mir-27a
	CC	~	
miR-34	CRC	<i>Akt1; Apc; Axin2; Bax; Bcl2; Braf; Ccnd1; Egfr; Jun; Kras; Lef1; Met; Mek1; Myc; Pik3ca; Tp53</i>	hsa-mir-34a/b/c
	CC	<i>Sirt1</i> **	
miR-96	CRC	<i>Akt1; Ccnd1; Kras; Mapk8; Myc; Tgfβ1; Tp53; Foxo</i> **	hsa-mir-96
	CC	<i>Rora1/2</i> ** <i>; Adcy6</i> ** <i>; Clock</i> **	
miR-182	CRC	<i>Akt1; Bax; Bcl2; Ccnd1; Egfr; Myc; Rac1; Tp53; Foxo</i> **	hsa-mir-182
	CC	<i>Rora1/2</i> ** <i>; Adcy6</i> ** <i>; Clock</i> **	
miR-141	CRC	<i>Akt1; Ccnd1; Jun; Mapk9; Met; Myc; Pik3ca; Tgfβ1/2; Tp53; Apc</i> [#]	hsa-mir-141
	CC	~~	
miR-142-3p	CRC	<i>Akt1; Ccnd1; Jun; Kras; Mapk8; Tp53; Apc</i> [#]	hsa-mir-142
	CC	<i>Bmal1</i> **	
miR-192	CRC	<i>Akt1; Apc; Birc5; Ccnd1; Cyps; Egfr; Kras; Pik3ca; Smad2/3; Tgfβ1; Tgfβr1; Tp53</i>	hsa-mir-192
	CC	<i>Per1</i> ** <i>; Per2</i> ** <i>; Per3</i> **	
miR-219	CRC	<i>Tgfβr2</i> [#]	hsa-mir-219-1/2
	CC	<i>Bmal1; Clock</i>	

CC – cirkadiánní hodiny

CRC – kolorektální karcinom

~ – predikován cirkadiánní rytmus

**přidaný ověřený gen

přidaný predikovaný gen

~~ – zaznamenán cirkadiánní rytmus

Na základě dat shrnutých v Tabulce 6.1. a 6.2. byly nalezeny tři miRNA regulující expresi hodinového proteinu CLOCK, miR-181d, miR-182 a miR-96, které hrají roli v apoptóze v CRC. MiR-181d se váže na *Bcl2*, miR-96 a miR-182 potlačují expresi proteinu FOXO, takže zabraňují apoptóze a zastavení buněčného cyklu. Navíc jsou miR-96 a miR-182 regulovány cirkadiánním proteinem RORα1.

MiR-191 a miR-142-3p negativně regulují hladinu BMAL1 svou vazbou na *Bmal1* mRNA. Tím miR-142-3p ovlivňuje i svou vlastní transkripci heterodimerem CLOCK:BMAL1. V CRC se miR-142-3p pravděpodobně účastní regulace proliferace buněk svým navázáním na APC. MiR-191 je spjat s procesem EMT, kde inhibuje TIMP3.

Potlačení *Per* genů zprostředkovávají miR-192 a miR-194, jež jsou součástí clusteru miR-192/194. Ten je sám nejprve indukován transkripčním faktorem p53, klíčovou složkou apoptózy a zastavení buněčného cyklu.

Mezi získanými miRNA byly i miR-1, miR-16, miR-30, miR-155 a let-7, jež inhibují CK1δ v CC. S výjimkou miR-155 působí tyto miRNA většinou jako tumor-supresory v různých signálních drahách CRC. Například let-7 potlačuje produkci KRAS a pravděpodobně i TGF-βRII. Zatímco miR-155 negativně reguluje expresi PTEN a stimuluje tak růst CRC.

Cirkadiánní exprese miR-26a je stimulována hodinovým proteinem CLOCK a vede ke stimulaci proliferace a potlačení apoptózy přes utlumení genů *Pten* a *Ccnd1*. Další miRNA miR-219 je exprimována pomocí CLOCK:BMAL1 heterodimeru, v CRC inhibuje TGF-βRII, čímž tlumí EMT.

CREB-indukovaná miR-132 reguluje geny podílející se na remodelaci chromatinu a translaci proteinů, což vede k oslabení hodin. V CRC není ještě přesná funkce miR-132 známá, asi se podílí na regulaci EMT pomocí vazby na ZEB2 a dále ovlivňuje buněčný cyklus.

U některých z výsledných miRNA je predikovaný cirkadiánní rytmus, jsou to miR-9 a miR-27. Obě tyto miRNA jsou spojené s transkripčním faktorem MYC. MiR-27 se účastní jeho regulace a miR-9 je jím indukována, načež miR-9 stimuluje proliferaci buněk translační represí *Cdh1* mRNA kódující E-kadherin. U miR-141 a miR-20a byl sice již cirkadiánní rytmus experimentálně ověřen, ale jeho funkce je zatím neznámá. MiR-141 je jednou z predikovaných miRNA, jež cílí na *Apc* a podporuje tak proliferaci buněk. Na rozdíl od miR-20a, která snižuje hladinu TGF-βRII a souvisí s indukcí EMT.

Zvláštním případem propojení tumorigeneze s regulací CC je miR-34, která se jí nepřímo účastní přes transkripční faktor SIRT1, který inhibuje. SIRT1 poté ovlivňuje klíčové geny CC. Samotná miR-34 je úzce spjatá s transkripčním faktorem p53 a regulací apoptózy.

Z dosažených dat můžeme usuzovat, že získané miRNA propojené jak s tumorigenezí, tak s regulací CC nejsou specifické jen pro určité dráhy či stadia CRC, ale prolínají se jimi v poměrně rovnoměrném zastoupení. Podobně je to s cirkadiánními geny, kde nedochází k přednostní regulaci nějakého určitého genu, ale regulace pokrývá pozitivní i negativní komponenty transkripčně-translační smyčky cirkadiánních hodin.

7 Závěr

MiRNA jsou nepopíratelně důležitou složkou regulace genové exprese. V této práci byl nastíněn jak proces biogeneze miRNA, tak mechanismus, jaký miRNA využívají k regulaci genové exprese. MiRNA jsou součástí regulace cirkadiánních rytmů i regulace kolorektálního karcinomu.

Existují miRNA, které jsou spjaté jak s regulací cirkadiánních hodin, tak s tumorigenezí kolorektálního karcinomu. V této práci bylo uvedeno 37 miRNA s touto charakteristikou a je velmi pravděpodobné, že toto číslo není konečné. Mnoho miRNA nemá ještě definovanou funkci a jejich role, hlavně v cirkadiánních hodinách, je nám zatím neznámá.

Narušení cirkadiánních hodin, například prostřednictvím dlouhodobé práce na směny, pravděpodobně může vést k různým změnám exprese některých miRNA, ať už prostřednictvím genetických a epigenetických změn, změn v biogenezi miRNA či regulaci transkripčních faktorů. Tyto miRNA se poté podílejí na regulaci hlavních molekulárních drah souvisejících mimo jiné s proliferací buněk, buněčnou smrtí, buněčným cyklem či migrací buněk. Tím by mohly miRNA indukovat vznik rakoviny či podpořit její vývoj.

Do budoucna je nutné hlouběji prozkoumat spojení miRNA s regulací cirkadiánních rytmů a při tumorigenezi. Mnou vytipované geny jsou vhodnými kandidáty pro toto studium. Pochopení mechanismů a komponentů tohoto vztahu nás může posunout k přesnějším diagnostickým metodám, vytipování rizikových skupin lidí pro specifické druhy rakoviny a k novým terapeutickým možnostem s větší úspěšností a menšími vedlejšími účinky.

8 Seznam zkratek

ADCY6	adenylcykláza VI.	eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
AGO	Argonaute	Elk1	ELK1, member of ETS oncogene family
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	EMT	epiteliálně-mezenchymální přechod
APC	adenomatous polyposis coli	Ep300	E1A binding protein p300
BCL2/6	B-cell CLL/lymphoma 2/6	ERK	extracellular signal-regulated kinase
bHLH-PAS	basic helix–loop–helix-Period–Arnt–Single-minded	ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
BMAL1	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	Exp5	Exportin 5
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	FLI1	Fli-1 proto-oncogene
BTG2	BTG family, member 2	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1
CC	cirkadiánní hodiny	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CCNE1	cyclin E1	FOXO	Forkhead box O
CDK4/6	cyclin-dependent kinase 4/6	GW182	trinucleotide repeat containing 6A
CDS	kódující sekvence	hnRNP	heterogenní jaderné ribonukleoproteiny
CK1δ/ε	kaseinkináza 1δ/ε	Chx10	visual system homeobox 2
c-kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	IFNα/β	interferon α/β
CLL	chronická lymfocytická leukémie	IRAKM	interleukin-1 receptor-associated kinase 3
CLOCK	clock circadian regulator	Jarid1a	lysine (K)-specific demethylase 5A
CRC	kolorektální karcinom	Klf5	Kruppel-like factor
CRE	c-AMP response element	KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
CREB	c-AMP response element-binding protein	LEF	lymphoid enhancer-binding factor
CRY1/2	cryptochrome circadian clock 1/2	LPS	lipopolysacharid
DGCR8	Di-Georgův syndrom kritického regionu genu 8	L-VGCC	napěťově řízený vápenatý kanál L-typu
DNMT3A/B	DNA-methyltransferáza 3A/3B	MAPK	mitogen-activated protein kinase
dsRBD	dvojřetězcová RNA-vážící doména	MECP2	methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)
E2f3	E2F transcription factor 3	MEK	mitogen-activated protein-kinase kinase
ECM	extracelulární matrix	MET	met proto-oncogene

EGFR	epidermal growth factor receptor	miRISC	miRNA indukovaný umlčující protein/miRNA induced silencing protein
miRNA	microRNA	RIIID	doména RNázy III
MMP3	matrix metalloproteinase 3	RORα	RAR-related orphan receptor A
mRNA	mediátorová RNA	RREB1	RAS responsive element binding protein 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin	SCN	suprachiasmatické jádro
Nampt	nicotinamide phosphoribosyltransferase	SIRT1	sirtuin 1
NF-κB	nuclear factor kappa-B	SMAD2/3/4	SMAD family member 2/3/4
nt	nukleotid	SNP	jednonukleotidový polymorfismus
Olf1	olfactory receptor, family 5, subfamily I, member 1	SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
Paip2a	poly(A) binding protein interacting protein 2a	ssRNA	jednořetězcová RNA
PDC	plazmacytoidní dendritické buňky	STAT	signal transducer and activator of transcription
PDCD4	programmed cell death 4	stRNA	malé, časově regulační RNA
Pdgfa	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
PEA3	ETS factor polyoma enhancer activator 3	TARBP2	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
PER1/2	period circadian clock 1/2	TCF	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase	TGF-β	transforming growth factor, beta
PIK3CD	PI3K catalytic subunit delta	TGF-βRI/II	transforming growth factor, beta receptor I/II
Pol II/III	RNA polymeráza II/III	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	TLR-7	toll-like receptor 7
Ppp2ca	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme	TNM	tumor node metastasis
pre-mir-RNA	prekurzor microRNA	UTR	nepřekládaný oblast, untranslated region
pri-mir-RNA	primární transkript microRNA	Wnt	wingless-type MMTV integration site family
PTEN	phosphatase and tensin homolog	YES	Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog
REV-ERBα	orphan nuclear receptor	ZEB1/2	zinc-finger E-box binding homeobox 1/2
RhoA	ras homolog family member A		

9 Seznam použité literatury

- Akao, Y., Nakagawa, Y., a Naoe, T. (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol. Rep.* 16, 845–850.
- Alvarez-Saavedra, M., Antoun, G., Yanagiya, A., Oliva-Hernandez, R., Cornejo-Palma, D., Perez-Iratxeta, et al. (2011). miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 20, 731–751.
- Ambros, V., Bartel, B., a Bartel, D. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9, 277–279.
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, et al. (2009). The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 31, 220–231.
- Bakirtzi, K., Hatziapostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D., et al. (2011). Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology* 141, 1749–61.e1.
- Balakrishnan, A., Stearns, A.T., Park, P.J., Dreyfuss, J.M., Ashley, S.W., Rhoads, et al. (2010a). MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts. *Exp. Cell Res.* 316, 3512–3521.
- Balakrishnan, A., Stearns, A.T., Park, P.J., Dreyfuss, J.M., Ashley, S.W., Rhoads, et al. (2010b). MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts. *Exp. Cell Res.* 316, 3512–3521.
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zárte, R., Ramirez, N., et al. (2006). Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol. Cancer* 5, 29.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., a Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.
- Braun, C.J., Zhang, X., Savelyeva, I., Wolff, S., Moll, U.M., Schepeler, T., et al. (2008). p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* 68, 10094–10104.
- Buchi, K.N., Moore, J.G., Hrushesky, W.J., Sothorn, R.B., a Rubin, N.H. (1991). Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology* 101, 410–415.
- Calin, G.A., a Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857–866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15524–15529.

Calin, G.A., Liu, C.-G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., et al. (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11755–11760.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., et al. (2004b). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004.

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., et al. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793–1801.

Cannell, I., a Bushell, M. (2010). Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? *Cell Cycle* **9**, 2798–2802.

Carthew, R.W., a Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655.

Castilla-Llorente, V., Nicastro, G., a Ramos, A. (2013). Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 861–865.

Ceppi, P., a Peter, M.E. (2014). MicroRNAs regulate both epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncogene* **33**, 269–278.

Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., a Nikitin, A.Y. (2007). MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* **67**, 8433–8438.

Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., et al. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7024–7029.

Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714.

Dews, M., Fox, J.L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y.Y., et al. (2010). The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res.* **70**, 8233–8246.

Duan, R., Pak, C., a Jin, P. (2007). Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1124–1131.

Dunand-Sauthier, I., Santiago-Raber, M.-L., Capponi, L., Vejnar, C.E., Schaad, O., Irla, M., et al. (2011). Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood* **117**, 4490–4500.

Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., a Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* **14**, 872–877.

Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., a Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* **44**, 839–847.

- Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., et al. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3627–3632.
- Eisenmann, D.M. (2005). Wnt signaling. *WormBook* 1–17.
- Emery, P., a Reppert, S.M. (2004). A rhythmic Ror. *Neuron* *43*, 443–446.
- Esquela-Kerscher, A., a Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 259–269.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., et al. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15805–15810.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., a Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.
- Farazi, T.A., Spitzer, J.I., Morozov, P., a Tuschl, T. (2011). miRNAs in human cancer. *J. Pathol.* *223*, 102–115.
- Fearon, E.R., a Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, et al. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18081–18086.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 12/4/2014.
- Figueredo, D. de S., Barbosa, M.R., Gitaí, D.L.G., a de Andrade, T.G. (2013). Predicted microRNAs for mammalian circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* *28*, 107–116.
- Finnegan, E.F., a Pasquinelli, A.E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *48*, 51–68.
- Gandellini, P., Folini, M., Longoni, N., Pennati, M., Binda, M., Colecchia, M., et al. (2009). miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res.* *69*, 2287–2295.
- Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S.-S., Nanganke, A., et al. (2009). miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* *16*, 498–509.
- Garzon, R., Marcucci, G., a Croce, C.M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 775–789.
- Gatfield, D., Le Martelot, G., Vejnar, C.E., Gerlach, D., Schaad, O., Fleury-Olela, et al. (2009). Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* *23*, 1313–1326.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., et al. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564–1569.

Goel, A., a Boland, C.R. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology* **143**, 1442–1460.e1.

Golombek, D.A., a Rosenstein, R.E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* **90**, 1063–1102.

Graziano, F., Canestrari, E., Loupakis, F., Ruzzo, A., Galluccio, N., Santini, D., et al. (2010). Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J.* **10**, 458–464.

Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* **32**, D109–11.

Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., a Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **34**, D140–4.

Guo, C., Sah, J.F., Beard, L., Willson, J.K. V, Markowitz, S.D., a Guda, K. (2008). The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes. Chromosomes Cancer* **47**, 939–946.

Gurtan, A.M., a Sharp, P.A. (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J. Mol. Biol.* **425**, 3582–3600.

Haller, F., von Heydebreck, A., Zhang, J.D., Gunawan, B., Langer, C., Ramadori, G., et al. (2010). Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J. Pathol.* **220**, 71–86.

Hanahan, D., a Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70.

Hanahan, D., a Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674.

Hansen, J. (2006). Risk of breast cancer after night- and shift work: current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control* **17**, 531–537.

Haus, E., a Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* **17**, 489–500.

Havens, M.A., Reich, A.A., Duelli, D.M., a Hastings, M.L. (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4626–4640.

Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., a Tollervey, D. (2013). Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* **153**, 654–665.

Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., et al. (2008). Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J. Clin. Invest.* **118**, 2600–2608.

Hirschler, B.A., Ding, X.C., a Grosshans, H. (2010). Translational control of endogenous microRNA target genes in *C. elegans*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **50**, 21–40.

- Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., et al. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* 23, 1327–1337.
- Cha, Y.H., Kim, N.H., Park, C., Lee, I., Kim, H.S., et al. (2012). MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell Cycle* 11, 1273–1281.
- Chang, H.-C., a Guarente, L. (2013). SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell* 153, 1448–1460.
- Chang, T.-C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., et al. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell* 26, 745–752.
- Chen, G., Zhu, W., Shi, D., Lv, L., Zhang, C., Liu, P., et al. (2010). MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol. Rep.* 23, 997–1003.
- Chen, X., Guo, X., Zhang, H., Xiang, Y., Chen, J., Yin, Y., et al. (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 28, 1385–1392.
- Cheng, H.-Y.M., a Obrietan, K. (2007). Revealing a Role of MicroRNAs in the Regulation of the Biological Clock. *Cell Cycle* 6, 3034–3038.
- Cheng, H.-Y.M., Papp, J.W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J.P., et al. (2007). microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 54, 813–829.
- Chin, L.J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., et al. (2008). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 68, 8535–8540.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R.W., et al. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 169, 1812–1820.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Luo, J., Mantha, G., Sobol, R.W., et al. (2007). Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 67, 2345–2350.
- Iorio, M. V, a Croce, C.M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* 4, 143–159.
- Iorio, M. V, Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., et al. (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 67, 8699–8707.
- Ji, M., Rao, E., Ramachandradeddy, H., Shen, Y., Jiang, C., Chen, J., et al. (2011). The miR-17-92 microRNA cluster is regulated by multiple mechanisms in B-cell malignancies. *Am. J. Pathol.* 179, 1645–1656.
- Kawamata, T., Seitz, H., a Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 953–960.

- Kent, O. a, Fox-Talbot, K., a Halushka, M.K. (2013). RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene* 32, 2576–2585.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376–385.
- Kim, V.N., a Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 22, 165–173.
- Ko, C.H., a Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15 *Spec No*, R271–7.
- Kojima, S., Gatfield, D., Esau, C.C., a Green, C.B. (2010). MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver. *PLoS One* 5, e11264.
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J., Coppola, D., Dalton, W.S., et al. (2008). MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6773–6784.
- Krol, J., Loedige, I., a Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610.
- Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., a Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 39, 673–677.
- Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., et al. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev.* 23, 2700–2704.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., et al. (1999). mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* 98, 193–205.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., a Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., a Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
- Lan, F., Yue, X., Han, L., Shi, Z., Yang, Y., Pu, P., et al. (2012). Genome-wide identification of TCF7L2/TCF4 target miRNAs reveals a role for miR-21 in Wnt-driven epithelial cancer. *Int. J. Oncol.* 40, 519–526.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., a Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.
- Lee, K.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-R., Kim, W., Kim, D.-Y., Shin, J.-C., et al. (2013). MicroRNA-185 oscillation controls circadian amplitude of mouse Cryptochrome 1 via translational regulation. *Mol. Biol. Cell* 24, 2248–2255.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., a Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Li, A., Lin, X., Tan, X., Yin, B., Han, W., Zhao, J., et al. (2013). Circadian gene Clock contributes to cell proliferation and migration of glioma and is directly regulated by tumor-suppressive miR-124. *FEBS Lett.* 587, 2455–2460.
- Li, M.-D., Li, C.-M., a Wang, Z. (2012). The role of circadian clocks in metabolic disease. *Yale J. Biol. Med.* 85, 387–401.
- Liao, W.-T., Ye, Y.-P., Zhang, N.-J., Li, T.-T., Wang, S.-Y., Cui, Y.-M., et al. (2014). MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J. Pathol.* 232, 415–427.
- Lieberman, D. (2010). Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. *Gastroenterology* 138, 2115–2126.
- Liu, L., Chen, L., Xu, Y., Li, R., a Du, X. (2010). microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 236–240.
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., et al. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7, 2591–2600.
- López, I., P Oliveira, L., Tucci, P., Alvarez-Valín, F., A Coudry, R., a Marín, M. (2012). Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* 499, 81–87.
- Louafi, F., Martinez-Nunez, R.T., a Sanchez-Elsner, T. (2010). MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 285, 41328–41336.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., a Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., a Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449, 682–688.
- Ma, L., Reinhardt, F., Pan, E., Soutschek, J., Bhat, B., Marcusson, E.G., et al. (2010a). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.* 28, 341–347.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., et al. (2010b). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 12, 247–256.
- Ma, Q., Wang, X., Li, Z., Li, B., Ma, F., Peng, L., et al. (2013). microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway. *Oncol. Rep.* 29, 1652–1658.
- Massagué, J., a Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745–1754.

Melo, S. a, Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L. a, Yamamoto, H., Calin, G., et al. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat. Genet.* **41**, 365–370.

Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., a Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**, 647–658.

Mrcochova, J., Faltejskova, P., Nemecek, R., Svoboda, M., a Slaby, O. (2013). MicroRNAs targeting EGFR signalling pathway in colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 1615–1624.

Myatt, S.S., Wang, J., Monteiro, L.J., Christian, M., Ho, K.-K., Fusi, L., et al. (2010). Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res.* **70**, 367–377.

N, T., Y, L., a L, W. (2009). MicroRNA mir-346 targets the 5prime-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression.

Na, Y.J., Sung, J.H., Lee, S.C., Lee, Y.J., Choi, Y.J., Park, W.Y., et al. (2009). Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm. *Exp. Mol. Med.* **41**, 638–647.

Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Oude Vrielink, J. a F., Bolijn, A., et al. (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.* **68**, 5795–5802.

Nagel, R., Clijsters, L., a Agami, R. (2009). The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock. *FEBS J.* **276**, 5447–5455.

Nishimura, J., Handa, R., Yamamoto, H., Tanaka, F., Shibata, K., Mimori, K., et al. (2012). microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **28**, 2221–2226.

Nottrott, S., Simard, M.J., a Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1108–1114.

O’Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., a Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7113–7118.

Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., et al. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* **23**, 2839–2849.

Ono, H., Imoto, I., Kozaki, K., Tsuda, H., Matsui, T., Kurasawa, Y., et al. (2012). SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene* **31**, 4923–4934.

Ota, T., Doi, K., Fujimoto, T., Tanaka, Y., Ogawa, M., Matsuzaki, H., et al. (2012). KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* **32**, 2271–2275.

Pagliuca, A., Valvo, C., Fabrizi, E., di Martino, S., Biffoni, M., Runci, D., et al. (2013). Analysis of the combined action of miR-143 and miR-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. *Oncogene* **32**, 4806–4813.

- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., et al. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* 109, 307–320.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., a Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 21, 533–542.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2, 269–276.
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., et al. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108, 3068–3071.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., et al. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Preitner, N., Damiola, F., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., a Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Qin, S., Zhu, Y., Ai, F., Li, Y., Bai, B., Yao, W., et al. (2014). MicroRNA-191 correlates with poor prognosis of colorectal carcinoma and plays multiple roles by targeting tissue inhibitor of metalloprotease 3. *Neoplasma* 61, 27–34.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., et al. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 26, 731–743.
- Reguart, N., He, B., Taron, M., You, L., Jablons, D.M., a Rosell, R. (2005). The role of Wnt signaling in cancer and stem cells. *Future Oncol.* 1, 787–797.
- Reid, J.F., Sokolova, V., Zoni, E., Lampis, A., Pizzamiglio, S., Bertan, C., et al. (2012). miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation. *Mol. Cancer Res.* 10, 504–515.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Reppert, S.M., a Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935–941.
- Richards, J., a Gumz, M.L. (2013). Mechanism of the circadian clock in physiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R1053–64.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., a Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910.

Ryan, B.M., Robles, A.I., a Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 10, 389–402.

Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., a Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17719–17724.

Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., et al. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435–443.

Santarosa, M., a Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim. Biophys. Acta* 1654, 105–122.

Scott, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., a Benz, C.C. (2006). Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 66, 1277–1281.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., a Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.

Sempere, L.F., Christensen, M., Silahtaroglu, A., Bak, M., Heath, C. V, Schwartz, G., et al. (2007). Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res.* 67, 11612–11620.

Shende, V.R., Neuendorff, N., a Earnest, D.J. (2013). Role of miR-142-3p in the post-transcriptional regulation of the clock gene Bmal1 in the mouse SCN. *PLoS One* 8, e65300.

Shi, L., Ko, M.L., a Ko, G.Y.-P. (2009). Rhythmic expression of microRNA-26a regulates the L-type voltage-gated calcium channel $\alpha 1C$ subunit in chicken cone photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 284, 25791–25803.

Shibuya, H., Iinuma, H., Shimada, R., Horiuchi, A., a Watanabe, T. (2010). Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* 79, 313–320.

Shukla, G.C., Singh, J., a Barik, S. (2011). MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol. Cell. Pharmacol.* 3, 83–92.

Soták, M., Polidarová, L., Ergang, P., Sumová, A., a Pácha, J. (2013). An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int. J. Cancer* 132, 1032–1041.

Soták, M., Sumová, A., a Pácha, J. (2014). Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer. *Ann. Med.* (in press), doi: 10.3109/07853890.2014.892296.

Staiger, D., a Köster, T. (2011). Spotlight on post-transcriptional control in the circadian system. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 71–83.

Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., a Krzyzosiak, W.J. (2014). The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* (in press).

Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., a Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533.

- Takahashi, J.S., Hong, H.-K., Ko, C.H., a McDearmon, E.L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775.
- Takahashi, R.-U., Miyazaki, H., a Ochiya, T. (2014). The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front. Genet.* 4, 295.
- Tavazoie, S.F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., et al. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147–152.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., a Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15472–15477.
- Tétreault, N., a De Guire, V. (2013). miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin. Biochem.* 46, 842–845.
- Thorstensen, L., Qvist, H., Heim, S., Liefers, G.J., Nesland, J.M., Giercksky, K.E., et al. (2000). Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2, 514–522.
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., et al. (2008). Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 68, 4123–4132.
- Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 311–330.
- Vickers, M.M., Bar, J., Gorn-Hondermann, I., Yarom, N., Daneshmand, M., Hanson, J.E.L., et al. (2012). Stage-dependent differential expression of microRNAs in colorectal cancer: potential role as markers of metastatic disease. *Clin. Exp. Metastasis* 29, 123–132.
- Vogelstein, B., Lane, D., a Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261.
- Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J.M., Stoop, H., Nagel, R., et al. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124, 1169–1181.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., a Lyko, F. (2007). Methylation of Human MicroRNA Genes in Normal and Neoplastic Cells. *Cell Cycle* 6, 1001–1005.
- Weng, L., Spencer, B.H., SoohHoo, P.T., Connors, L.H., O’Hara, C.J., a Seldin, D.C. (2011). Dysregulation of miRNAs in AL amyloidosis. *Amyloid* 18, 128–135.
- Wightman, B., Burglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P., a Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3′-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 5, 1813–1824.

- Wolpin, B.M., a Mayer, R.J. (2008). Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134, 1296–1310.
- Wu, J., Qian, J., Li, C., Kwok, L., Cheng, F., Liu, P., et al. (2010). miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression. *Cell Cycle* 9, 1809–1818.
- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., a Zhang, C. (2013). MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 42, 219–228.
- Xu, S., Witmer, P.D., Lumayag, S., Kovacs, B., a Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 25053–25066.
- Xu, X.M., Qian, J.C., Deng, Z.L., Cai, Z., Tang, T., Wang, P., et al. (2012). Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 4, 339–345.
- Yamakuchi, M. (2012). MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front. Physiol.* 3, 68.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., a Lowenstein, C.J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13421–13426.
- You, J., Li, Y., Fang, N., Liu, B., Zu, L., Chang, R., et al. (2014). MiR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells via targeting the EMT regulator ZEB2. *PLoS One* 9, e91827.
- Zavadil, J., a Böttinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–5774.
- Zhang, J., Han, C., a Wu, T. (2012). MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology* 143, 246–56.e8.
- Zhao, S., a Liu, M.-F. (2009). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Sci. China. C. Life Sci.* 52, 1111–1116.
- Zheng, G., Wang, H., Zhang, X., Yang, Y., Wang, L., Du, L., et al. (2013). Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *PLoS One* 8, e83025.
- Zhong, M., Bian, Z., a Wu, Z. (2013). miR-30a suppresses cell migration and invasion through downregulation of PIK3CD in colorectal carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* 31, 209–218.
- Zhou, H., Huang, X., Cui, H., Luo, X., Tang, Y., Chen, S., et al. (2010). miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 116, 5885–5894.
- Zhu, H., Dougherty, U., Robinson, V., Mustafi, R., Pekow, J., Kupfer, S., et al. (2011). EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators. *Mol. Cancer Res.* 9, 960–975.